



Marta Filipa Mota Vieira

Licenciatura em Bioquímica

Arsenito oxidase bacteriana: caracterização a nível molecular

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Doutora Célia Maria Valente Romão
Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva



Marta Filipa Mota Vieira

Licenciatura em Bioquímica

**Arsenito oxidase bacteriana:
caracterização a nível molecular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Doutora Célia Maria Valente Romão
Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro, 2016

Arsenito oxidase bacteriana: caracterização a nível molecular

Copyright © em nome de Marta Filipa Mota Vieira, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Dedico esta dissertação aos meus pais, Gabriela e Luís, ao meu irmão Tiago e ao meu namorado André. Um profundo obrigado por nunca terem duvidado, pela infinita dedicação, apoio que sempre me deram e por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos. Sem vocês não tinha, garantidamente, chegado onde cheguei. Obrigado por tudo!

Aos meus avós, Maria, Elias e Arlete, por mesmo sem entenderem bem o que faço sempre terem acreditado em mim e me terem apoiado incondicionalmente.

Ao meu avô Brás, um eterno obrigado por tudo o que me ensinou. Mesmo não estando presente espero que estejas orgulhoso avô!

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, ao Departamento de Química, e a todos os Professores que me acompanharam ao longo desta jornada e tornaram possível a realização deste trabalho, o meu reconhecido agradecimento.

À Professora Doutora Maria João Romão, pela oportunidade que novamente me proporcionou de poder realizar o meu trabalho no Laboratório de Cristalografia de proteínas.

À minha orientadora, Professora Doutora Teresa Santos-Silva, manifesto um enorme agradecimento e uma imensa gratidão pela permanente orientação e preocupação e pela oportunidade de abertura de horizontes de conhecimento que me fizeram crescer tanto a nível profissional como pessoal. Não queria ter escolhido outra pessoa!

Ao Filipe Freire, Marino Santos e Francisco Leisico um especial, enorme e eterno agradecimento pela vossa infundável paciência, disponibilidade e ajuda, sem as quais este trabalho teria sido definitivamente mais difícil. Um obrigado não chega!

À minha companheira Raquel Costa, pelo companheirismo e apoio nos momentos passados ao longo deste ano.

A todos os restantes membros do Xtal, que desde o primeiro dia, sempre se mostraram disponíveis e prontamente empenhados em ajudar, os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Joanne Santini, Cameron Watson e todos os membros do grupo de Microbiologia Ambiental do Institute of Structural and Molecular Biology, University College of London, com os quais tive o privilégio de poder trabalhar, um sincero agradecimento por todo o conhecimento que me transmitiram e por terem enriquecido uma das melhores experiências da minha vida.

Aos meus amigos Inês Araújo, Ana Petrucci, Hugo Monteiro, Ana Ferreira, Inês Prates, Mariana Viegas e Mariana Mendes por todo o vosso apoio e amizade.

Por último, mas não menos importante, um obrigado especial ao meu cão Lucas, o melhor e mais paciente companheiro do mundo.

Muito obrigado a todos!

Resumo

O arsênio encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, decorrente de processos naturais e antropogênicos. É geralmente encontrado nas formas de arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)], altamente tóxicas. A arsenito oxidase (Aio) é uma enzima metabólica responsável pela oxidação de arsenito a arsenato.

A estrutura cristalográfica da Aio do oxidante de arsenito *Alphaproteobacterium Rhizobium* sp. NT-26 foi previamente determinada a 2,7 Å de resolução. O principal objetivo deste trabalho é contribuir para a clarificação do mecanismo de reação da enzima através da caracterização estrutural da Aio nativa de NT-26 ligada a análogos do substrato, bem como vários mutantes da enzima, recorrendo à cristalografia de raios-X e ensaios cinéticos com base em espectroscopia de UV/Vísivel.

Na presente dissertação são descritos os vários passos executados desde a mutagenese dirigida, expressão e purificação, cristalização, resolução e análise da estrutura e cinética enzimática, da proteína nativa e mutantes em estudo.

Usando polietilenoglicol (PEG), como agente precipitante, foi possível obter cristais da proteína nativa e dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A, permitindo a determinação das suas estruturas tridimensionais a 1,89; 2,18 e 2,20 Å de resolução, respetivamente.

Os estudos com AioAB nativa na presença de antimonito indicam a ligação deste ao centro ativo da enzima, a cerca de 1,7 Å do ligando hidroxilo do molibdénio. Estes resultados sugerem que a ligação do substrato fisiológico, arsenito, será feita de forma semelhante, apesar de, na estrutura obtida, não se ter verificado a presença de um sexto ligando do molibdénio, como expectável de acordo com o mecanismo proposto na literatura, provavelmente devido a danos causados pela radiação.

As estruturas cristalográficas dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A mostram a presença dos resíduos mutados e a ausência de alterações globais na estrutura da proteína. Os ensaios cinéticos realizados mostram a diminuição de atividade no mutante AioA Q726G e o aumento de atividade no mutante AioB F108A, evidenciando a importância dos resíduos mutados no mecanismo reacional da arsenito oxidase.

Através de mutagenese dirigida foram preparados outros mutantes da subunidade A - D169A/N e E453A/Q – que serão, de futuro, utilizados para ensaios cinéticos e determinação das estruturas cristalográficas, seguindo as metodologias aqui descritas.

Palavras-chave: Arsênio, arsenito oxidase, molibdoenzimas, cristalografia de raios-X, mutagenese dirigida, cinética enzimática.

Abstract

Arsenic is broadly distributed in the environment, arising from both natural and anthropogenic processes. It is commonly found in the highly toxic forms of arsenite [As(III)] and arsenate [As(V)]. Arsenite oxidase (Aio) is a metabolic enzyme that is responsible for the oxidation of arsenite into arsenate.

The crystal structure of Aio from the arsenite oxidizer *Alphaproteobacterium Rhizobium* sp. NT-26 was previously determined at 2,7 Å resolution. Our aim is to contribute for the elucidation of the reaction mechanism of the enzyme by structurally characterizing native NT-26 Aio bound to substrate analogs, as well as several mutants of the enzyme, using a combination of X-ray crystallography and kinetics assays based on UV/Visible spectroscopy.

In the present dissertation all the steps conducing to the desired goals are described in detail, such as site-directed mutagenesis, expression and purification, crystallization, structure determination and analysis and kinetic assays, for the native protein and the mutants under study.

Using polyethylene glycol (PEG), as precipitating agent, it was possible to obtain crystals of the native protein and the mutants AioA Q726G and AioB F108A, allowing the determination of its tridimensional structures to 1,89; 2,18 and 2,20 Å resolution, respectively.

The studies with native AioAB indicate the formation of adducts with antimonite, where the ligand is found at ca 1,7 Å from the molybdenum hydroxo apical ligand. These results suggest a similar binding for the physiological substrate, arsenite, even though the sixth oxo ligand of the molybdenum is not observed, as expected according to the mechanism proposed in the literature, probably due to radiation damage effects.

Crystal structures of AioA Q726G and AioB F108A mutants show the presence of the mutated residues and the absence of global changes in protein structure. Preliminary kinetic experiments show a decrease in the activity in AioA Q726G and an increase in AioB F108A, indicating the relevance of the mutated residues in the reaction mechanism of arsenite oxidase.

Using site-directed mutagenesis different mutants were also prepared, namely D169A/N and E453A/Q. In the future, these will be used for structural determination and kinetic assays, using the same methodologies here described.

Keywords: Arsenic, arsenite oxidase, molybdoenzymes, X-ray crystallography, site-directed mutagenesis, enzyme kinetic assays.

Índice

| | |
|---|------|
| Agradecimentos..... | I |
| Resumo | III |
| <i>Abstract</i> | V |
| Índice | VII |
| Índice de Figuras | XI |
| Índice de Tabelas | XV |
| Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos..... | XVII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Metais pesados e arsénio | 3 |
| 1.1.1. Características e formas químicas de arsénio | 4 |
| 1.1.2. Origem, distribuição e ciclo biogeoquímico de arsénio no ambiente | 5 |
| 1.1.3. Toxicidade e risco da exposição a arsénio | 7 |
| 1.1.4. Remediação de arsénio..... | 9 |
| 1.2. Metabolismo microbiano e resistência a arsénio | 11 |
| 1.2.1. Oxidação aeróbia de arsenito por Procariontes | 12 |
| 1.2.1.1. Arsenito oxidase: genes codificantes e regulação da expressão genética. | 13 |
| 1.3. Arsenito oxidase de <i>α-proteobacterium Rhizobium</i> , sp. NT-26 | 15 |
| 1.3.1. Descrição da estrutura | 15 |
| 1.3.1.1. Subunidade maior (AioA) e centro de molibdénio | 17 |
| 1.3.1.2. Subunidade de Rieske (AioB) | 19 |
| 1.3.2. Via de transporte eletrónico | 19 |
| 1.3.3. Comparação com estruturas de outras molibdoenzimas..... | 21 |
| 1.4. Cristalografia de raios-X..... | 21 |
| 1.4.1. Cristalização de proteínas: conceitos básicos | 23 |
| 1.4.2. Difração de raios-X e Resolução da estrutura | 26 |
| 1.4.3. Construção do modelo, Refinamento e Validação | 30 |
| 2. Objetivos..... | 33 |
| 3. Materiais e Métodos | 37 |
| 3.1. Clonagem dos genes <i>aioBA</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NT-26..... | 39 |
| 3.2. Expressão Heteróloga da arsenito oxidase de <i>Rhizobium</i> sp. NT-26 | 39 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.3. | Purificação da arsenito oxidase de <i>Rhizobium</i> sp. NT-26 | 40 |
| 3.3.1. | Cromatografia de afinidade por íons metálicos e diálise..... | 41 |
| 3.3.2. | Cromatografia de afinidade por íons metálicos e dessalinização | 42 |
| 3.3.3. | Cromatografia de exclusão molecular | 42 |
| 3.4. | Ensaio de cristalização e <i>soaking</i> | 43 |
| 3.5. | Recolha de dados de difração de raios-X e resolução da estrutura tridimensional.... | 45 |
| 3.6. | Ensaio cinético por Espectroscopia de UV/Visível | 46 |
| 3.7. | Mutagenese dirigida da subunidade AioA..... | 46 |
| 3.7.1. | Reação de amplificação com recurso ao <i>kit</i> QuikChange® II XL | 47 |
| 3.7.2. | Transformação de células competentes XL10-Gold | 48 |
| 3.7.3. | Otimização de condições no procedimento de mutagenese dirigida..... | 48 |
| 3.7.4. | Reação de amplificação com recurso ao <i>kit</i> NZYMutagenesis..... | 49 |
| 3.7.5. | Transformação de células competentes DH5α | 49 |
| 4. | Resultados e Discussão | 51 |
| 4.1. | Estudos com AioAB nativa | 53 |
| 4.1.1. | Clonagem e expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| 4.1.2. | Purificação de AioAB nativa | 55 |
| 4.1.3. | Cristalografia de raios-X..... | 59 |
| 4.1.3.1. | Ensaio de cristalização e experiência de difração de raios-X..... | 59 |
| 4.1.3.2. | Resolução da estrutura e refinamento | 63 |
| 4.1.3.3. | Caracterização da estrutura | 68 |
| 4.2. | Estudos com mutantes AioA Q726G e AioB F108A | 72 |
| 4.2.1. | Clonagem, mutagenese dirigida, expressão heteróloga em <i>E.coli</i> e purificação | 72 |
| 4.2.2. | Cristalografia de raios-X..... | 74 |
| 4.2.2.1. | Ensaio de cristalização e experiência de difração de raios-X..... | 74 |
| 4.2.2.2. | Resolução das estruturas e refinamento..... | 78 |
| 4.2.2.3. | Caracterização das estruturas | 79 |
| 4.2.3. | Ensaio cinético por Espectroscopia de UV/Visível | 83 |
| 4.3. | Mutagenese dirigida da subunidade AioA..... | 87 |
| 5. | Conclusões e perspectivas futuras | 91 |
| 6. | Bibliografia | 99 |

| | |
|----------------|-----|
| 7. Anexos..... | 107 |
|----------------|-----|

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Distribuição mundial dos principais países afetados por contaminação de arsênio em aquíferos, e regiões afetadas por atividade mineira e fontes geotermiais. | 4 |
| Figura 1.2. Ciclo biogeoquímico global de arsênio. | 6 |
| Figura 1.3. Mecanismo reacional de metabolização de arsênio inorgânico. | 7 |
| Figura 1.4. Processos utilizados na remoção de arsênio. | 9 |
| Figura 1.5. Diversidade filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA de espécies conhecidas de procariontes dos domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> que participam na redução ou oxidação de oxianíons de arsênio. | 12 |
| Figura 1.6. Organização dos genes de arsenito oxidase de diferentes organismos oxidantes de As(III). | 15 |
| Figura 1.7. Estrutura da arsenito oxidase de <i>Alphaproteobacterium Rhizobium</i> , sp. NT-26, obtida por cristalografia de raios-X (código de acesso PDB: 4AAY). | 16 |
| Figura 1.8. Domínios I-IV da subunidade catalítica AioA. | 17 |
| Figura 1.9. Centro ativo da Aio, constituído pelo átomo de molibdénio coordenado por um cofator bis-MGD e um átomo de oxigénio, e resíduos His199, Asn200, Arg201, Glu207, Arg447 e His 451 presentes na base do canal de solvente, ligado pelos domínios I, II e III. | 18 |
| Figura 1.10. Geometria quadrangular piramidal do átomo de Mo do centro ativo, coordenado por um cofator de molibdopterina na forma de duas moléculas de MGD e um ligando oxo. | 18 |
| Figura 1.11. Mecanismo de reação proposto para a arsenito oxidase. | 20 |
| Figura 1.12. Principais etapas envolvidas na determinação de estruturas tridimensionais (3D) de macromoléculas biológicas, por cristalografia de raios-X..... | 22 |
| Figura 1.13. Representação esquemática de um cristal. | 23 |
| Figura 1.14. Diagrama de fases para o processo de cristalização de proteínas. | 25 |
| Figura 1.15. Técnicas de cristalização por difusão de vapor. | 26 |
| Figura 1.16. Representação esquemática da Lei de Bragg. | 27 |
| Figura 1.17. Representação esquemática da experiência de difração de raios-X. | 28 |
| Figura 3.1. Constructo utilizado para expressão dos genes <i>aioA</i> e <i>aioB</i> | 39 |
| Figura 4.1. Regulação da expressão dos genes <i>aioBA</i> sobre controlo do promotor Trc, indutível por IPTG. | 54 |
| Figura 4.2. Cromatograma obtido na primeira etapa de purificação por IMAC. | 55 |
| Figura 4.3. SDS-PAGE (12,5 %) com as frações provenientes da etapa de expressão e do primeiro passo de purificação da arsenito oxidase. | 56 |
| Figura 4.4. Cromatograma obtido na segunda etapa de purificação por IMAC. | 57 |
| Figura 4.5. Cromatograma obtido na terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. | 58 |
| Figura 4.6. SDS-PAGE (12,5 %) com as frações de várias etapas da purificação. | 58 |
| Figura 4.7. Cristais de AioAB obtidos a 4 °C e 20 °C. | 60 |
| Figura 4.8. Padrão de difração obtido para o cristal de AioAB incubado com $[K_3(Fe(CN)_6)]$ e $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ | 61 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.9. (A) Representação gráfica da subunidade AioA na estrutura do complexo SbO ₃ –AioAB. (B) Caracterização estrutural preliminar do aducto estabelecido entre antimonito e a arsenito oxidase.. | 70 |
| Figura 4.10. Resultados de SDS-PAGE (12,5 %) obtidos para os mutantes AioA Q726G (A) e AioB F108A (B)..... | 73 |
| Figura 4.11. Cristais de AioA Q726G (A, B) e AioB F108A (C) obtidos a 4 °C pela técnica de gota assente..... | 76 |
| Figura 4.12. Padrões de difração obtidos para os cristais de AioA Q726G (A) e AioB F108A (B)..... | 77 |
| Figura 4.13. Representação do centro ativo da subunidade AioA nas estruturas do mutante AioA Q726G (A) e nativa (B) da arsenito oxidase de NT-26. | 80 |
| Figura 4.14. Representação do centro de Rieske da subunidade AioB nas estruturas do mutante AioB F108A (A) e na estrutura nativa (B) da arsenito oxidase de NT-26. | 82 |
| Figura 4.15. Reação de redução de DCPIP, desencadeada pela oxidação de arsenito a arsenato..... | 83 |
| Figura 4.16. Representação gráfica do ensaio cinético para a AioAB nativa. | 84 |
| Figura 4.17. Representação gráfica do ensaio cinético para o mutante AioA Q726G. | 85 |
| Figura 4.18. Representação gráfica do ensaio cinético para o mutante AioB F108A. | 86 |
| Figura 4.19. Resultados de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) dos produtos de amplificação obtidos. | 89 |
| Figura 7.1. Diagramas de espécies inorgânicas de As(III) e As(V) em água. | 108 |
| Figura 7.2. Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos. | 109 |
| Figura 7.3. Representação esquemática das 14 redes <i>Bravais</i> | 109 |
| Figura 7.4. Mapa e sequência do vetor de expressão pProex-HTb (Invitrogen) utilizado para clonagem dos genes <i>aioBA</i> | 110 |
| Figura 7.5. Resultados da purificação por IMAC: Cromatogramas e análise eletroforética em condições desnaturantes das frações recolhidas. (A) AioA Q726G; (B) AioB F108A. | 113 |
| Figura 7.6. Cromatogramas obtidos na segunda etapa de purificação dos mutantes em estudo por IMAC. | 113 |
| Figura 7.7. Cromatogramas obtidos na terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. (A) AioA Q726G; (B) AioB F108A. | 114 |
| Figura 7.8. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para a AioAB nativa. | 115 |
| Figura 7.9. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos de AioAB nativa. | 115 |
| Figura 7.10. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para o mutante AioA Q726G. | 116 |
| Figura 7.11. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos do mutante AioA Q726G. | 116 |

| | |
|---|-----|
| Figura 7.12. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para o mutante AioB F108A. | 117 |
| Figura 7.13. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos do mutante AioB F108A. | 117 |
| Figura 7.14. Estrutura dos 20 aminoácidos essenciais. | 118 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1.1. Principais formas químicas de arsénio. | 4 |
| Tabela 3.1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>aioB</i> e <i>aioA</i> de NT-26. | 39 |
| Tabela 3.2. Proporção de soluções precipitantes utilizadas para os ensaios de cristalização da arsenito oxidase de NT-26. | 43 |
| Tabela 3.3. Ensaios de variação de temperatura testados na realização de ensaios de cristalização da arsenito oxidase. | 44 |
| Tabela 3.4. Sequências de oligonucleótidos utilizadas para a reação de amplificação dos vários mutantes em estudo. | 47 |
| Tabela 3.5. Parâmetros utilizados na reação de amplificação para o <i>kit</i> QuikChange® II XL. | 47 |
| Tabela 3.6. Novas sequências de oligonucleótidos utilizadas para a realização de mutagenese dirigida e obtenção dos mutantes D169A, E543A, D169N e E453Q. | 48 |
| Tabela 3.7. Parâmetros utilizados na reação de amplificação com o <i>kit</i> NZYMutagenesis. | 49 |
| Tabela 4.1. Estatísticas de qualidade dos dados de difração do cristal de AioAB com $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ | 62 |
| Tabela 4.2. Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para a estrutura de AioAB com $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ | 66 |
| Tabela 4.3. Fatores de ocupação e fatores B dos ligandos de antimonito presentes na estrutura da AioAB. | 69 |
| Tabela 4.4. Concentração final de proteína após purificação. | 74 |
| Tabela 4.5. Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A. | 77 |
| Tabela 4.6. Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A. | 79 |
| Tabela 4.7. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos da AioAB nativa. | 84 |
| Tabela 4.8. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos do mutante AioA Q726G. | 85 |
| Tabela 4.9. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos do mutante AioB F108A. | 87 |
| Tabela 4.10. Resultados obtidos na sequenciação dos mutantes da subunidade AioA D169A/N e E453A/Q. | 90 |
| Tabela 7.1. Principais tecnologias de remoção de As de águas contaminadas. | 108 |
| Tabela 7.2. Composição do meio de expressão LB utilizado na expressão em <i>E.coli</i> | 110 |
| Tabela 7.3. Condições de cristalização dos <i>screens</i> de cristalização 80! e Salt-Rx1. | 111 |
| Tabela 7.4. Código genético para Bactéria, Archaea e Plantas. | 118 |

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

α – Fases da onda

ϵ – Coeficiente de extinção molar

ΔG – Energia Livre de Gibbs

λ – Comprimento de onda

ϕ – Ângulo em torno da ligação N-C α da cadeia peptídica

ψ – Ângulo em torno da ligação C-C α da cadeia peptídica

I_{hkl} – Intensidade da reflexão

σ_{hkl} – Erro associado a cada intensidade

ρ_{xyz} – Densidade eletrônica

$|F_{hkl}|$ – Amplitude do Fator de Estrutura

$|F_{calc}|$ – Amplitude do Fator de Estrutura calculado

$|F_{obs}|$ – Amplitude do Fator de Estrutura observado

Å – Angstrom

Aio – Arsenito oxidase

Ala – Alanina

Amp – Ampicilina

Arg – Arginina

As – Arsénio

As(III) – Arsenito

As(V) – Arsenato

Asp – Ácido aspártico

Asn – Asparagina

ATP – Adenosina trifosfato

BER – Reparação por excisão de bases (do inglês *Base Excision Repair*)

CCP4 – *Collaborative Computational Project Number 4*

CoA – Acetil coenzima A

COOT – *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

Cys – Cisteína

DCPIP – 2,6- Diclorofenolindofenol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DTT – Ditioneitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E_h – Potencial *redox*

ESRF – *European Synchrotron Radiation Facility*

Gln – Glutamina

Glu – Glutamato

Gly – Glicina

F – Amplitude da onda

F_{hkl} – Fator de estrutura

F_{calc} – Fator de estrutura calculado

F_{obs} – Fator de estrutura observado

FT – Transformada de Fourier

FT⁻¹ – Transformada de Fourier inversa

h,k,l – Índices de Miller

HEPES – (4-(2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico)

His – Histidina

His6 – Seis resíduos de Histidina

IMAC – Cromatografia de Afinidade por iões metálicos imobilizados (do inglês *Immobilized-metal affinity chromatography*)

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactósido

kDa – kiloDalton

LB – Luria-Bertani

Lys – Lisina

MAD – Dispersão Anómala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)

MGD – *Molybdopterin guanine dinucleotide*

MIR – Substituição Isomórfica Múltipla (do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*)

Mo – Molibdénio

Moco – Cofator de molibdénio (do inglês *molybdenum cofactor*)

MR – Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)

NaCl – Cloreto de sódio

NER – Reparação por excisão de nucleótidos (do inglês *Nucleotide Excision Repair*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

Phe – Fenilalanina

PDB – *Protein Data Bank*

PEG – Polietilenoglicol

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

Rpm – Rotações por minuto

SAD – Dispersão Anómala Simples (do inglês *Single Wavelength Anomalous Dispersion*)

Sb – Antimónio

Sb(III) – Antimonito

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Ser – Serina

SLS – *Swiss Light Source*

TAT – *Twin Arginine Translocation*

TEV – *Tobacco Etch Virus* nuclear-inclusion-a endopeptidase

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UV/Visível – Ultra-violeta/Visível

V_M – Coeficiente de Matthews

1. Introdução

1.1. Metais pesados e arsénio

A ação química dos metais pesados tem despertado grande interesse a nível ambiental, nomeadamente pelo facto de estes elementos não apresentarem carácter de biodegradabilidade.

Os metais pesados tendem a permanecer em ciclos biogeoquímicos globais, principalmente em águas naturais, podendo haver acumulação dos mesmos em níveis significativamente elevados. Uma vez absorvidos, os metais pesados podem ligar-se a proteínas e serem transportados na corrente sanguínea, até aos tecidos, onde se depositam ou sofrem processos de biotransformação. Os efeitos tóxicos podem ser considerados letais ou sub letais, tendo em conta que o grau de intoxicação depende da forma química em que o metal se apresenta, da sua concentração, do tempo e da via de exposição, estando este último fator relacionado com a capacidade de absorção do metal por parte das células e da suscetibilidade dos órgãos afetados (Jomova *et al.*, 2009; Tchounwou *et al.*, 2012).

Os metais pesados são elementos químicos com densidade pelo menos 5 vezes superior à da água e número atómico superior a 20. São geralmente tóxicos em concentrações elevadas e tendem a acumular-se nos organismos vivos ao longo do tempo constituindo um potencial risco ambiental e para a saúde humana. Estes elementos químicos são considerados não essenciais e poluentes quando se encontram em quantidade superior ao normal ou fora do seu local habitual, trazendo consequências negativas para os organismos (Alloway, 2013; Varennes, 2003).

Embora não seja considerado um metal pesado, o arsénio (As) também exhibe características de toxicidade para o ambiente e para os seres vivos (Rahman & Hasegawa, 2011).

O arsénio é tóxico para a maioria das células vivas na generalidade dos organismos. Em meados de 1990 foi detetada, na Ásia, a poluição crónica de águas subterrâneas com As e, desde essa altura, tem sido crescente o número de locais em que se registou a poluição de As em aquíferos, solos e materiais (Chatterjee *et al.*, 1995; DPHE/BGS/MML, 1999).

Muitas das águas subterrâneas mundiais (Figura 1.1) utilizadas como fontes de água potável, estão contaminadas com As, e o consumo das mesmas pode conduzir ao desenvolvimento de diversas patologias e, em última análise, levar à morte. Foi estimado que a saúde de 200 milhões de pessoas em mais de 70 países em todo o mundo encontra-se em risco pelo consumo de águas subterrâneas contaminadas por As (Hopenhayn, 2006; Smedley & Kinniburgh, 2002; Yu *et al.*, 2003).



Figura 1.1. Distribuição mundial dos principais países afetados por contaminação de arsênio em aquíferos, e regiões afetadas por atividade mineira e fontes geotermiais. As áreas assinaladas a azul correspondem a lagos (Adaptado de Smedley & Kinniburgh, 2002).

1.1.1. Características e formas químicas de arsênio

O arsênio é um elemento químico com número atômico 33 que possui um único isótopo estável (^{75}As) e apresenta uma massa atômica média de $74,92 \text{ g mol}^{-1}$. É o quadragésimo sétimo elemento mais abundante de 88 elementos que ocorrem naturalmente, e apresenta uma abundância na crosta terrestre de aproximadamente $1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$. Pertencente ao grupo 15 da Tabela Periódica, com uma configuração eletrônica de $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^3$, é considerado um metalóide ou ametal, revelando propriedades metálicas e não metálicas. Pode existir em diversos estados de oxidação, nomeadamente $\text{As}(-\text{III})$, $\text{As}(-\text{I})$, $\text{As}(0)$, $\text{As}(\text{III})$ e $\text{As}(\text{V})$, como se pode visualizar na Tabela 1.1 (Turpeinen *et al.*, 2002).

Tabela 1.1. Principais formas químicas de arsênio. O arsênio nos estados de oxidação $\text{As}(-\text{I})$ e $\text{As}(0)$ existe apenas no estado sólido, como constituinte de minerais (por exemplo arsenopirite $[\text{FeAsS}]$) e na forma elementar (As), respetivamente.

| Estado de oxidação de As | Formas gasosas | Formas aquosas | Formas orgânicas |
|--|---|---|---|
| $\text{As}(-\text{III})$ | Arsina $[\text{H}_3\text{As}]$ Trimetilarsina $[\text{As}(\text{CH}_3)_3]$ | - | - |
| $\text{As}(-\text{I})$, $\text{As}(0)$ | - | - | - |
| $\text{As}(\text{III})$ | - | Arsenito $[\text{AsO}_3^{3-}]$ Arsenito monohidrogénio $[\text{HAsO}_3^-]$ Arsenito dihidrogénio $[\text{H}_2\text{AsO}_3^-]$ Ácido arsenoso $[\text{H}_3\text{AsO}_3]$ | - |
| $\text{As}(\text{V})$ | - | Arsenato $[\text{AsO}_4^{3-}]$ Arsenato monohidrogénio $[\text{HAsO}_4^{2-}]$ Arsenato dihidrogénio $[\text{H}_2\text{AsO}_4^-]$ Ácido arsénico $[\text{H}_3\text{AsO}_4]$ | - |
| As orgânico | - | - | Ácido monometilarsínico (MMAA) $[\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2]$ Ácido dimetilarsínico (DMAA) $[(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}]$ Dimetilarsina $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ |

O principal composto de As, na forma gasosa, é a arsina, altamente tóxica (consultar Tabela 1.1). No meio ambiente, a arsina só se forma em condições redutoras. Com a descida do pH do meio, a formação de arsina torna-se mais favorável, constatável, por exemplo, pela libertação de arsina, bem como mono-, di- e tri-metilarsina em superfícies de solos pantanosos e pântanos em condições anóxicas. Estas formas gasosas podem, no entanto, ser facilmente convertidas por oxidação a espécies de As(V) em fase aquosa (Chauhan *et al.*, 2008; Duker *et al.*, 2005; Sharma & Sohn, 2009; Turpeinen *et al.*, 2002).

Em fase aquosa, o arsénio é talvez único entre outros metais pesados e elementos formadores de oxianíons, como selénio, antimónio, molibdénio e vanádio, no que diz respeito à sua sensibilidade de mobilização a valores de pH tipicamente encontrados em águas subterrâneas (pH 6,5 - 8,5), tanto em condições oxidantes como redutoras. Como referido anteriormente, no meio ambiente, o arsénio pode ocorrer em diversos estados de oxidação. No entanto, em águas naturais é maioritariamente encontrado na forma inorgânica como oxianíons de arsenito [As(III)] ou arsenato [As(V)]. As formas orgânicas de arsénio, como ácido monometilarsónico (MMAA), ácido dimetilarsínico (DMAA) e dimetilarsina (consultar Tabela 1.1), podem ser produzidas por atividade biológica, principalmente em meios aquosos, mas raramente são relevantes de um ponto de vista quantitativo.

Os principais fatores que controlam a especiação de As em águas naturais são o potencial redox (Eh) e pH (consultar Anexo 1, Figura 7.1). Condições redutoras (anaeróbias) e acídicas tendem a estabilizar as espécies As(III), enquanto que em condições oxidantes (aeróbias) e a valores de pH mais elevados, predominam as suas espécies equivalentes de As(V) (Turpeinen *et al.*, 2002).

1.1.2. Origem, distribuição e ciclo biogeoquímico de arsénio no ambiente

O arsénio provém de fontes naturais e antropogénicas. Embora se encontre naturalmente distribuído na crosta terrestre, solo, sedimentos, água e seres vivos, as fontes antropogénicas existem numa proporção de 3:1 face às fontes naturais (Bundschuh *et al.*, 2012).

As fontes naturais de contaminação por arsénio estão principalmente associadas a fenómenos geotermais e vulcânicos. Naturalmente, o As existe como constituinte de mais de 200 minerais, encontrando-se principalmente na forma de arsenopirite (FeAsS).

As principais fontes antropogénicas de As são a atividade mineira e a indústria metalúrgica, embora a queima de combustíveis fósseis também seja uma importante fonte de contaminação atmosférica (Bundschuh *et al.*, 2012).

O arsénio encontra-se amplamente presente em água, desde rios, lagos e estuários, oceanos e águas subterrâneas e até na precipitação, podendo a sua concentração variar entre valores baixos ($<0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e valores extremamente elevados ($1058000 \mu\text{g L}^{-1}$).

Em rios, lagos e oceanos a concentração de As pode atingir $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, a distribuição heterogênea de As na crosta terrestre, juntamente com fatores climáticos, pode resultar em concentrações de As mais elevadas, como é o caso de Mono Lake na Califórnia (EUA), no qual a concentração de As atinge valores entre $10\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$. Em águas residuais, frequentemente contaminadas com As, as concentrações deste elemento variam geralmente entre $<0,5 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na atmosfera, o arsênio encontra-se maioritariamente em forma de partículas e provém de mobilização eólica, vulcões, aerossóis marinhos e, mais significativamente, de processos industriais. É depositado no solo, quase na sua totalidade, pela queima de combustíveis fósseis (Plant *et al.*, 2007).

A maioria das rochas contém concentrações bastante baixas de As. No que diz respeito a solos e sedimentos a concentração de As varia amplamente. Sedimentos naturais, como areias aluviais em aquíferos poluídos com As, apresentam baixas concentrações de As (geralmente $<10 \text{mg Kg}^{-1}$). Por sua vez, sedimentos e solos contaminados por atividades industriais contêm maiores concentrações de As, atingindo valores até vários milhares de mg Kg^{-1} . Estes valores são devidos ao intemperismo dos minerais que contêm As, ou às elevadas concentrações deste tipo de minerais e compostos em materiais residuais (BGS & DPHE, 2001).

Embora, no meio ambiente, o arsênio se encontre maioritariamente na forma sólida, este é frequentemente transportado, e entra no seu ciclo biogeoquímico, na forma de espécies aquosas ou como partículas extremamente finas. O ciclo de As, apresentado na Figura 1.2, entre formas sólidas e líquidas, é em grande parte controlado por processos de sorção a superfícies minerais e orgânicas, como adsorção, precipitação e permuta iônica, que dependem de vários fatores.

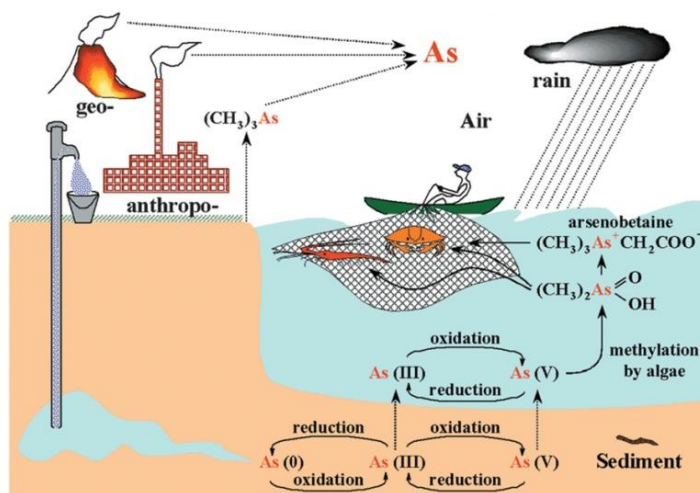


Figura 1.2. Ciclo biogeoquímico global de arsênio. Arsenato, o principal composto de arsênio em água do mar, é acumulado por organismos marinhos e convertido em compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácido metilarsônico ou ácido dimetilarsínico, ou em formas de armazenamento orgânicas que são então segregadas para o meio ambiente. Algum do arsênio é retido pelos organismos e metabolizado em compostos orgânicos mais complexos, como arsenolípido e arsenoaçúcar. Posteriormente os organoarsênicos são convertidos a arsenobetaína, por sua vez degradada pelo metabolismo microbiano para formas inorgânicas, concluindo o ciclo biológico de arsênio em biosistemas marinhos (Adaptado de Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

1.1.3. Toxicidade e risco da exposição a arsénio

O arsénio é um elemento de ocorrência natural classificado como carcinogénico humano na base de evidências epidemiológicas (IARC, 2009). É libertado no ambiente por diversos processos e a partir de várias fontes. Devido à passagem de água por solos e rochas contaminadas, o As pode ser encontrado na água potável de consumo de milhões de pessoas em todo o mundo, por vezes a concentrações mais elevadas do que as consideradas seguras, causando grandes problemas de saúde num elevado número de regiões. Deste modo, a contaminação ambiental por As representa um sério risco para a saúde humana (ATSDR, 2007; Rahman *et al.*, 2008a; Rahman & Hasegawa, 2011).

A exposição crónica a As, principalmente por consumo de água contaminada, tem sido associada, em seres humanos, a um aumento da incidência de cancro, assim como outras patologias nomeadamente queratose, doenças vasculares, neuropatia periférica, diabetes e, em último caso, morte (Abernathy *et al.*, 1999; Cantor *et al.*, 2006; Ferreccio *et al.*, 2000).

A extensão do envenenamento por arsénio depende de vários fatores, nomeadamente dose, suscetibilidade individual em metabolizar As e idade dos indivíduos afetados.

Como referido anteriormente, o arsénio ambiental pode ser encontrado nas formas orgânica e inorgânica. Uma vez no corpo, o arsénio inorgânico (i-As) é rapidamente absorvido e distribuído no sangue em direção aos tecidos, onde, por sua vez, sofre biotransformação, principalmente no fígado. O metabolismo de i-As, envolve a redução de arsenato [As(V)] a arsenito [As(III)], mediada pela enzima glutatona (GSH), seguindo-se a metilação oxidativa para formar arsénio orgânico pentavalente, na forma de ácido metilarsónico [MMA(V)], como se pode visualizar na Figura 1.3.

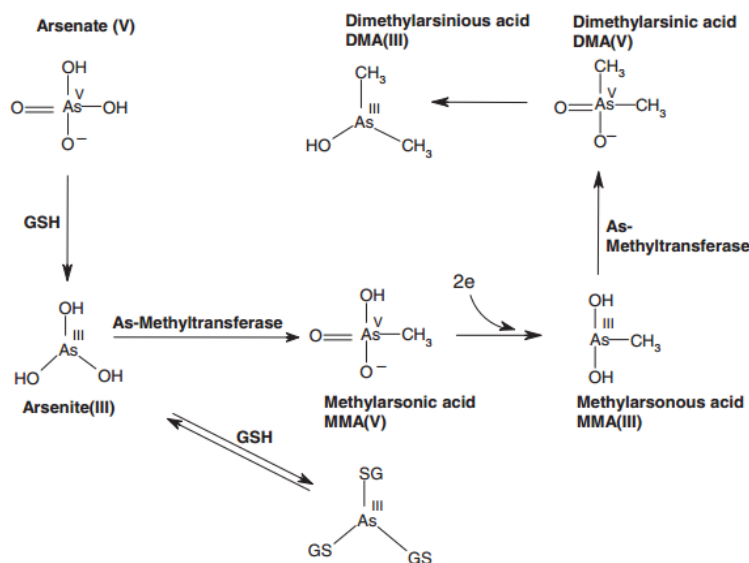


Figura 1.3. Mecanismo reacional de metabolização de arsénio inorgânico (Adaptado de Hughes *et al.*, 2002).

Por sua vez, o MMA(V) é alvo de reduções e metilações sequenciais, até à excreção do produto final na urina. Embora a metilação tenha sido, inicialmente, considerada uma forma de desintoxicação de As inorgânico (i-As) prejudicial, o seu papel foi redefinido quando a toxicidade dos metabolitos orgânicos de As, como ácido monometilarsônico [MMA(III)], foi considerada muito mais elevada comparativamente às suas espécies inorgânicas relacionadas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta descoberta permitiu o estabelecimento de uma estreita relação entre o metabolismo de As e a toxicidade, genotoxicidade e potencial carcinogénico, derivados da exposição a As (Stybło *et al.*, 2002; Kligerman & Tennaut, 2007).

A carcinogénese é um processo complexo que envolve mecanismos genotóxicos e não-genotóxicos e, embora os mecanismos exatos ainda não se encontrem totalmente esclarecidos, têm sido várias as hipóteses apresentadas para explicar a carcinogenicidade do As. Primeiramente, o arsénio pode atuar como co-carcinogénico ao inibir as enzimas de reparação de DNA, tendo sido demonstrado que este pode danificar os mecanismos de reparação por excisão de nucleótidos (NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*) e de reparação por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) (Li & Rossman, 1989).

A carcinogénese mediada por As também pode incluir mecanismos epigenéticos, podendo ser responsável pela alteração dos padrões de metilação, tanto no DNA como ao nível de promotores de genes, bem como da estrutura da cromatina e expressão de miRNA (Ren *et al.*, 2011).

Adicionalmente, o i-As e os seus derivados orgânicos são considerados citotóxicos e capazes de desencadear apoptose celular, tendo sido demonstrado que as formas trivalentes de As conseguem induzir apoptose em diversos sistemas celulares com envolvimento de recetores de morte celular, ativação de caspases, libertação de reservas de cálcio e alteração dos níveis intracelulares de glutatona.

Por último, os efeitos carcinogénicos de As podem envolver stress oxidativo. Vários estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que compostos de As induzem a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e aumentam a produção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG), um marcador genericamente utilizado para avaliação de danos oxidativos em DNA (Hei & Filipie, 2004; Kinoshita *et al.*, 2007).

A nível genotóxico, o arsénio pode causar mutações cromossómicas, isto é, pode atuar como clastogénico. Verifica-se uma evidência direta para os efeitos genotóxicos em humanos expostos a As, tanto ambientalmente como ocupacionalmente. Os efeitos genotóxicos de As também podem ser indiretos, na medida em que podem afetar a atividade de reparação, potenciando a genotoxicidade de outros carcinogénicos-mutagénicos orgânicos, particularmente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), incluindo benzo[α]pireno (BAP) (Basu *et al.*, 2001; Danaee *et al.*, 2004; Hei & Filipie, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Palus *et al.*, 2005).

1.1.4. Remediação de arsénio

Face à elevada toxicidade de As impõe-se a tomada de medidas que minimizem os seus impactos. A organização mundial de saúde (WHO do inglês *World Health Organization*) recomendou o nível contaminante máximo de arsénio em água de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, mas as reservas de água de consumo em muitos países contém níveis bastante mais elevados, existindo uma necessidade urgente para o desenvolvimento de métodos eficientes para remoção de As.

As tecnologias convencionais de remoção do arsénio baseiam-se num conjunto de processos físico-químicos básicos: reações de oxidação-redução, coagulação, precipitação, adsorção, permuta iónica e filtração por membranas (consultar Anexo 1, Tabela 7.1) (Cheng *et al.*, 1994).

Em água, estas técnicas são mais eficientes na remoção de As(V) do que As(III). A remoção de As(III) de ambientes contaminados implica, primeiramente, a sua oxidação, geralmente conseguida pela adição de agentes oxidantes como ozono ou peróxido de hidrogénio (Figura 1.4) (Kim & Nriagu, 2000).

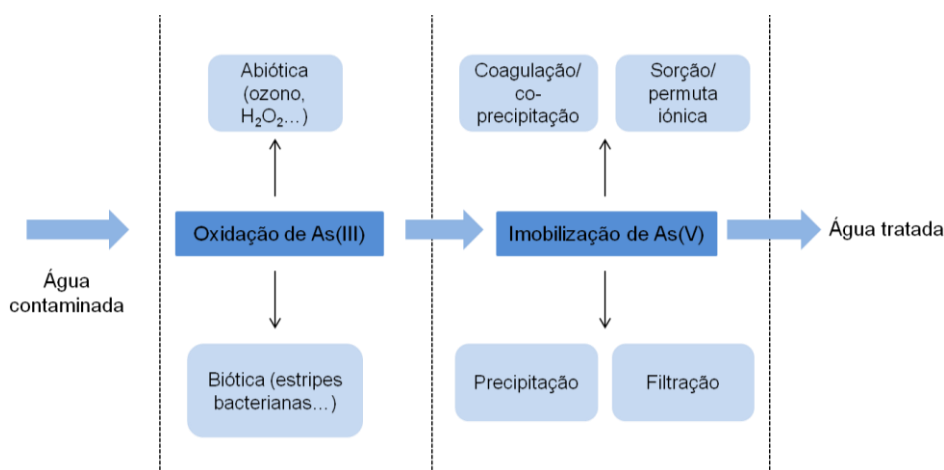


Figura 1.4. Processos utilizados na remoção de arsénio (Adaptado de Kim & Nriagu, 2000).

As técnicas convencionalmente utilizadas na remoção de As, apresentam, no entanto, algumas limitações, nomeadamente a adição de produtos químicos à água, necessidade de cuidados de segurança no manuseamento, produção de um grande volume de lamas com elevadas quantidades de arsénio, necessidade de tratamentos complementares, interferência de alguns iões (por exemplo sulfatos), custos de instalação e operação elevados e por vezes baixa eficiência de remoção.

Neste sentido, e para responder ao desafio de reduzir a concentração de arsénio para o valor paramétrico recomendado de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, novos desenvolvimentos na área da biotecnologia visando processos eficientes e ambientalmente sustentáveis tem sido conseguidos, destacando a tecnologia emergente de fito-remediação na qual é utilizada biomassa (plantas e fungos) como material adsorvente.

Embora o mecanismo de remoção utilize compostos químicos, como nas tecnologias convencionais, a capacidade adsorvente da biomassa é superior e suscetível de regeneração (Casiot *et al.*, 2003; Katsoyiannis e Zouboulis, 2004; Murugesan *et al.*, 2006).

O mecanismo de remoção de arsénio através da utilização de microrganismos é diferente do de fito-remediação. Nestes casos, a conversão de arsenito em arsenato faz-se através de uma enzima extracelular, sendo as formas oxidadas adsorvidas ou precipitadas no filme biológico aderente ao respetivo suporte físico. A bioconversão do arsenito pode ser também realizada por metilação ou oxidação-redução das formas de arsénio presentes na água, podendo a sua eficiência ser aumentada através de modificações genéticas dos microrganismos atuantes (Kostal *et al.*, 2004).

Assim sendo, a oxidação bacteriana de As(III), abordada na presente dissertação, pode constituir uma alternativa segura comparativamente aos métodos químicos. Embora, até à data, a maioria dos estudos de oxidação bacteriana de arsenito tenham sido realizados com bioreatores de pequena escala, estes sistemas ativos parecem promissores e estarão de certeza em funcionamento, num futuro próximo, pelo menos numa combinação com sistemas passivos, desenhados para aumentar a ocorrência natural de processos físicos, químicos e biológicos (Lièvremon *et al.*, 2003).

A implementação de sistemas ativos requer o conhecimento da fisiologia e metabolismo bacterianos. Nestes sistemas, que requerem o fornecimento contínuo de energia, a especiação de As é controlada por processos microbianos, pelo que o primeiro passo envolve a escolha da cultura pura adequada, a partir de uma estirpe de bactéria oxidante de As(III) isolada anteriormente. Até à data, a utilização de culturas puras tem sido apenas investigada a uma escala de bancada (Lièvremon *et al.*, 2003; Mondal *et al.*, 2008).

Por sua vez, tratamentos passivos dizem respeito a processos com a mínima intervenção e manutenção humana. Utilizam materiais de construção naturais, promovem o crescimento de vegetação natural e fontes de energias naturalmente disponíveis, como energia do metabolismo microbiano, entre outras. Todos estes tratamentos dependem de atenuação natural: a combinação *in situ* de processos físicos, químicos e biológicos que, em condições favoráveis, atuam na ausência de intervenção humana, no sentido de reduzir a massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração de contaminantes em solos ou águas subterrâneas (Wang & Mulligan, 2006).

Estes processos encontram-se ainda numa fase embrionária, desconhecendo-se a eficiência e fiabilidade destes processos aplicados ao tratamento de águas contaminadas com arsénio.

1.2. Metabolismo microbiano e resistência a arsénio

Pensa-se que o arsénio possa desempenhar um papel central no metabolismo microbiano e que a atividade microbiana pode ter um impacto significativo nas formas de As existentes no meio ambiente, influenciando a sua especiação, mobilidade e toxicidade.

O metabolismo de As por parte de organismos procariontes, detetado em ambientes hidrotermais, temperados e frios, está envolvido no ciclo *redox* do arsénio. De facto, as bactérias desempenham um papel fundamental, sendo, de forma direta ou indireta, responsáveis pela maioria das transformações *redox* de As no meio ambiente (Osborne *et al.*, 2010).

A oxidação de arsenito [As(III)] é conhecida há quase um século. Green reportou uma estirpe bacteriana com esta atividade em 1918. Investigações posteriores, na década de 70, permitiram a descoberta generalizada de resistência a As, mas foi apenas na década de 80 que os mecanismos de resistência foram decifrados e descobertos, paradoxalmente, para envolver a redução de arsenato [As(V)]. Foi descoberto que alguns microrganismos não eram somente resistentes como também eram capazes de ganhar energia proveniente da transformação de oxianíons de As, levando à total reapreciação do metabolismo microbiano de As e do seu papel no ciclo biogeoquímico (Oremland & Stolz, 2003; Oremland *et al.*, 2005; Rhine *et al.*, 2005; Rosen, 2002; Silver & Phung, 2005).

Os microrganismos desenvolveram uma variedade de métodos de forma a conseguirem tolerar arsénio. Os mecanismos envolvidos são baseados em três características elementares do As: em primeiro lugar, que As(III) é mais tóxico que As(V), ligando-se a grupos tióis de proteínas, inibindo a ação de várias enzimas, nomeadamente da enzima piruvato desidrogenase, o que resulta na redução de conversão de piruvato a acetil coenzima A (CoA), e conseqüentemente, na diminuição de atividade do ciclo de ácido cítrico e produção de adenosina trifosfato (ATP). As(III) inibe também a captação de glucose pelas células, a gluconeogénese, a oxidação de ácidos gordos, bem como a produção de glutatona. Em segundo lugar, As(III) pode entrar nas células através de aquagliceroporinas ou pode ser gerado nas células a partir de processos redutores. Por último, As(V) é um análogo do ião fosfato, entrando nas células através do sistema de transporte de fosfato, interferindo com a fosforilação oxidativa e outras reações que envolvam o oxianião (Jomova *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2002; Rosen, 2002; Tsai *et al.*, 2009).

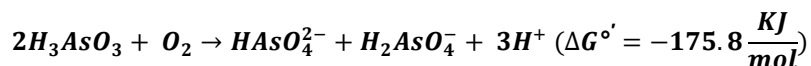
Um dos mecanismos conhecidos por conferir resistência a As é o sistema ArsC. Este sistema envolve várias proteínas que transportam e removem As das células, formando um complexo enzimático do tipo ABC (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

A metilação é outro mecanismo que pode conferir resistência a As. Como referido anteriormente, neste mecanismo, o arsenato é primeiramente reduzido a arsenito e, de seguida, metilado (Stolz *et al.*, 2006).

As bactérias oxidantes de arsenito isoladas até à data incluem acidófilos, como *Acidocaldus* sp. Estirpe AO5 e *Hydrogenobaculum acidophilum* estirpe H55, termófilos, como *Thermus* sp. Estirpe HR13, e mesófilos, nomeadamente *Alphaproteobacterium Rhizobium* sp. NT-26, NT-14 e *Alcaligenes faecalis* (D'Imperio *et al.*, 2007; Donahoe-Christiansen *et al.*, 2004; Gihring & Banfield, 2001; Osborne & Ehlirch, 1976; Phillips & Taylor, 1976; Santini *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2002).

A maioria destes organismos são heterotróficos aeróbios ou quimiolitotóxicos, mas também existem exemplos de organismos que realizam oxidação de As(III) em condições anóxicas, utilizando um aceitador de eletrões alternativo, como nitrato, ou através de fotossíntese anoxigénica. A arsenito oxidase que funciona sob condições anaeróbias, designada por Arx é distinta da Aio, sendo que apenas a última foi purificada e caracterizada até à data (Budinhoff & Hollibaugh, 2008; Kulp *et al.*, 2008).

Os organismos quimiolitotóxicos oxidantes de arsenito não necessitam de uma fonte orgânica de carbono para crescer, uma vez que são capazes de fixar carbono inorgânico nas formas de CO₂ ou HCO₃⁻. No crescimento quimiolitotóxico os organismos ganham energia ao utilizar As(III) como o único dador de eletrões e acoplando a sua oxidação à redução de O₂ a H₂O, de acordo com a equação apresentada de seguida, na qual o valor de ΔG°' demonstra que a energia está disponível a partir da oxidação aeróbia de As(III) (Santini *et al.*, 2000).



As estirpes *Rhizobium* sp. NT-26, isolada de arsenopirites de uma mina de ouro na Austrália e *Thiomonas* sp. Estirpe 3As, isolada de uma mina em Carnoulès, França são os quimiolitotóxicos mais estudados até à data (Duquesne *et al.*, 2008; Santini *et al.*, 2000).

Por sua vez, as bactérias oxidantes de As(III) heterotróficas requerem uma fonte de carbono para o seu crescimento ou podem ser auxotróficas para um nutriente particular, por exemplo um aminoácido. Dos organismos heterotróficos oxidantes de arsenito isolados até à data, *Alcaligenes faecalis* é o mais estudado relativamente à sua enzima arsenito oxidase (Aio) (Anderson *et al.*, 1992).

1.2.1.1. Arsenito oxidase: genes codificantes e regulação da expressão genética

A Aio pertence à família das molibdoenzimas com complexos de ferro-enxofre (Rothery *et al.*, 2008).

As subunidades AioA e AioB são codificadas pelos genes *aioA* e *aioB*, respetivamente, que foram identificados e sequenciados em vários organismos oxidantes aeróbios de As(III). Em todos os aglomerados de genes destes organismos, o gene *aioB* encontra-se localizado a montante do gene *aioA*.

Várias das Proteobactérias oxidantes de As(III) possuem outros genes envolvidos na oxidação de arsenito localizados a montante ou a jusante dos genes *aioA* e *aioB*, respetivamente. Os genes que codificam um sensor de histidina quinase (*aioS*) e um regulador de resposta (*aioR*) estão localizados a montante da região que codifica os genes de arsenito oxidase e envolvem um sistema de transdução de sinal de dois componentes que regula a transcrição dos genes *aioA* e *aioB* (Sardiwal *et al.*, 2010).

O gene designado por *aioX* também é conservado a montante de *aioB* em Proteobactérias oxidantes de As(III) e codifica uma proteína de ligação a As(III) periplasmática essencial para a regulação dos genes *aioA* e *aioB*. Os genes que codificam citocromos do tipo c (*cytC*) estão localizados a jusante do gene *aioA* em alguns aglomerados do gene *aio*. O gene *cytC* no aglomerado de genes *aio* de NT-26 codifica um aceitador de eletrões fisiológico para a Aio. Os genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de cofatores de molibdénio (*moaA* e *moaB*) também estão localizados a jusante do gene *aioA* em alguns oxidantes de As(III) (Santini *et al.*, 2007).

No que diz respeito à regulação da expressão genética, em muitos organismos que oxidam arsenito, a conversão química de As(III) em As(V) é regulada positivamente por exposição a As(III). No entanto, a exposição a As(III) não afeta, por si só, a expressão dos genes de arsenito oxidase, existindo vários mecanismos moleculares implicados na resposta bacteriana à exposição de As(III).

O mecanismo mais comum envolve um sistema de transdução de sinal putativo de dois componentes, codificado pelos genes *aioS* e *aioR* (designados juntamente por *aioSR*), associado ao controlo transcricional da arsenito oxidase. No entanto, nalguns casos existe uma correlação clara entre os níveis de expressão de genes de arsenito oxidase (*aioAB*) e a fase de crescimento de população, sugerindo que o mecanismo de *quorum sensing* também pode estar envolvido na regulação da expressão genética (Sardiwal *et al.*, 2010).

Embora seja claro que, em muitos casos, as proteínas codificadas pelos genes *aioS* e *aioR* constituam componentes essenciais para a regulação de atividade da arsenito oxidase, a organização dos genes não é conservada em todos os organismos em que foram identificados, como se pode visualizar na Figura 1.6 (Kashyap *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007).

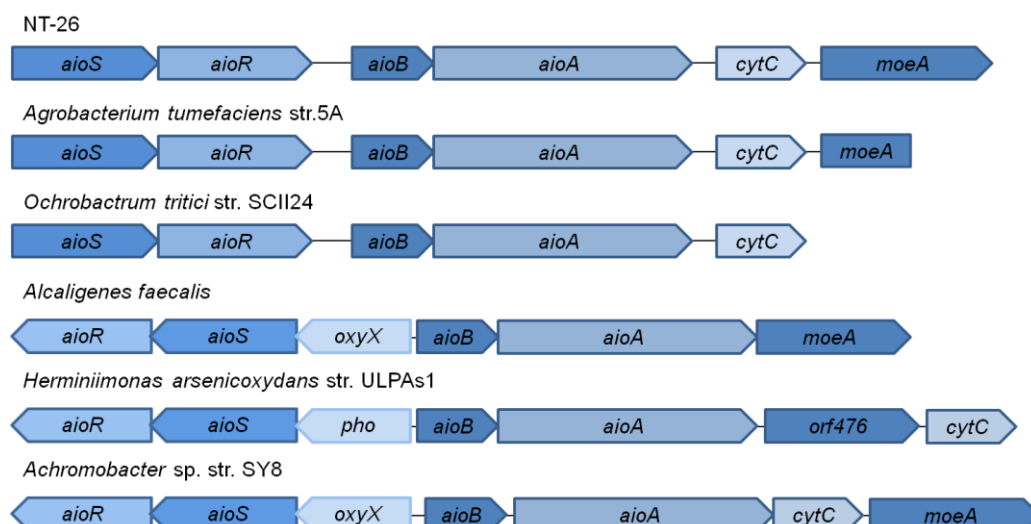


Figura 1.6. Organização dos genes de arsenito oxidase de diferentes organismos oxidantes de As(III). Na figura encontram-se representados os genes *aioS*, *aioR*, *aioA* e *aioB*, *cytC* e *moeA*, *oxyX* (codifica o gene de ligação de oxianióes) e *pho* (transportador ABC de fosfato/fosfonato) (Adaptado de Sardiwal *et al.*, 2010).

Em algumas espécies, como é o caso de NT-26, os genes *aioSR* estão orientados na mesma direção dos genes *aio*, enquanto que noutras espécies, como *A. faecalis*, estão presentes na direção oposta (Branco *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2009; Kashyap *et al.*, 2006; Sardiwal *et al.*, 2010).

1.3. Arsenito oxidase de *α -proteobacterium Rhizobium*, sp. NT-26

1.3.1. Descrição da estrutura

A arsenito oxidase foi isolada e purificada de uma variedade de organismos (Anderson *et al.*, 1992; Lieutaud *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2009; Santini & vanden Hoven, 2004; vanden Hoven & Santini, 2004).

Na presente dissertação será estudada a enzima Aio do organismo *Alphaproteobacterium Rhizobium*, sp. NT-26. Até à data, existe depositada uma estrutura obtida por cristalografia de raios-X desta enzima, determinada a uma resolução máxima de 2,70 Å (código de acesso PDB 4AAY) (Warelow *et al.*, 2013).

Esta enzima é constituída por duas subunidades heterólogas (α -AioA e β -AioB), como se pode visualizar na Figura 1.7. A subunidade catalítica α (AioA) de maior peso molecular, contém um átomo de molibdénio coordenado por duas pterinas, e um centro [3Fe-4S]. A subunidade β (AioB) mais pequena, contém um centro de Rieske [2Fe-2S]. As duas subunidades associam-se numa estrutura que contém uma rede de ligações de hidrogénio na interface entre subunidades (Ellis *et al.*, 2001; Warelow *et al.*, 2013).

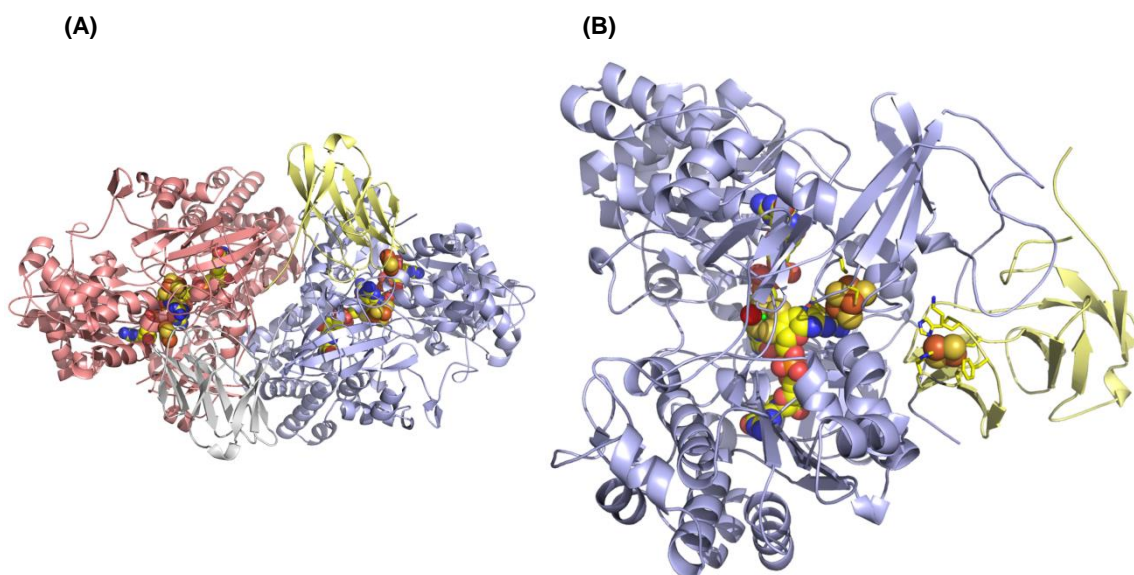


Figura 1.7. Estrutura da arsenito oxidase de *Alphaproteobacterium Rhizobium*, sp. NT-26, obtida por cristalografia de raios-X (código de acesso PDB: 4AAY). (A) Representação da estrutura heterotetramérica da Aio de NT-26, constituída por dois heterodímeros $\alpha\beta$, correspondente à forma funcional da enzima. No primeiro e segundo heterodímeros, as subunidades α e β encontram-se representadas a azul e amarelo, e vermelho e cinzento, respetivamente. (B) Representação da estrutura heterodimérica da Aio de NT-26. A Aio contém uma subunidade α (AioA) e uma subunidade β (AioB), representadas a azul e amarelo, respetivamente. O cofator de pterina e os centros metálicos [3Fe-4S] e Rieske [2Fe-2S] encontram-se representados na forma esférica. Os resíduos que se ligam aos centros metálicos estão também representados. Código de cores: ferro – castanho alaranjado; enxofre – amarelo vivo; carbono – amarelo claro; molibdénio – verde; fósforo – laranja; oxigénio – vermelho e azoto – azul (Adaptado de Warellow *et al.*, 2013).

Nesta enzima, o íão de molibdénio localiza-se numa cavidade em forma de funil altamente solvatada, na subunidade AioA, e é coordenado por dois cofatores bis-MGD, três moléculas de água e um ligando oxo. Dado que a Aio possui duas moléculas de piranopterina a coordenar o átomo de molibdénio, esta pode ser atribuída à família dimetilsulfóxido redutase das molibdoenzimas (DMSO do inglês *dimethylsulfoxide reductase*). No entanto, ao contrário da generalidade das proteínas desta família, o átomo de Mo não está ligado a aminoácidos como Ser, Cys, Asp ou SeCys.

Relativamente a distâncias entre os centros redox, o centro [3Fe-4S] encontra-se a ~ 14 Å do átomo Mo, enquanto que os dois centros Fe-S estão separados por uma distância de ~ 15 Å (Ellis *et al.*, 2001; Warellow *et al.*, 2013).

A Aio de NT-26 é na sua forma funcional um heterotetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) de 219 kDa. No entanto, o estado oligomérico da Aio é variável entre organismos oxidantes de arsenito, sendo que a enzima NT-14 de *Hydrogenophaga* é, na sua forma funcional um heterohexâmero ($\alpha_3\beta_3$) e *A. faecalis* e *Ralstonia* (estirpe 22) são heterodímeros ($\alpha_1\beta_1$). Todas estas enzimas catalisam a oxidação de As(III) a As(V), embora apresentem ligeiras variações no seu enrolamento e afinidade para o respetivo substrato.

1.3.1.1. Subunidade maior (AioA) e centro de molibdênio

A subunidade maior da Aio, constituída por 825 aminoácidos, é composta por uma totalidade de quatro domínios, como se pode visualizar na Figura 1.8. Cada domínio apresenta uma topologia de sandwich α - β - α (hélice-folha-hélice) e exibe homologia estrutural significativa com outros membros de Fe-S desta família (Ellis *et al.*, 2001).

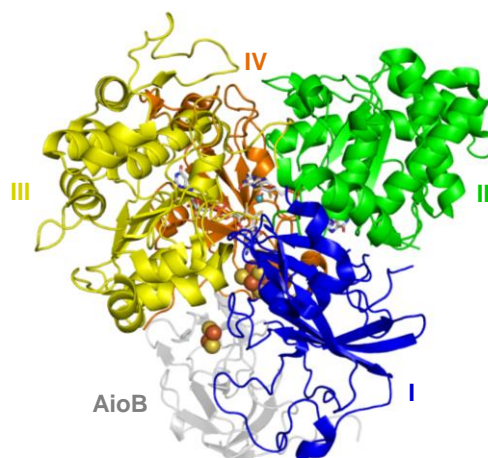


Figura 1.8. Domínios I-IV da subunidade catalítica AioA. Os domínios I, II, III e IV encontram-se representados a azul, verde, amarelo e laranja, respetivamente. Na figura encontram-se também representada a cinzento a subunidade AioB, o átomo de Mo, cofatores de pterina e os centros metálicos [3Fe-4S] e Rieske [2Fe-2S]. A imagem foi gerada no programa Pymol (DeLano, 2002).

O domínio I, constituído por três folhas- β antiparalelas e seis hélices- α , liga-se ao centro [3Fe-4S], coordenado pelo motivo Cys24-X₂-Cys27-X₃-Cys31-Ser98, perto da interface dos domínios III e IV. A presença de um resíduo de serina, em vez de um resíduo de cisteína, no último motivo de ligação a este centro metálico, que se pensa estar envolvido no processo de transferência eletrónica, é responsável pela formação de um centro [3Fe-4S], em oposição ao centro [4Fe-4S] presente, por exemplo, na enzima formato desidrogenase e outros membros da família DMSO que possuem resíduos de cisteína nesta posição (Boyington *et al.*, 1997).

Os domínios II e III estão relacionados na estrutura da proteína por um pseudoeixo de simetria de grau 2 e ambos possuem enrolamentos de ligação dinucleotídica homólogos. O domínio II é constituído por uma folha β (com 7 cadeias β) maioritariamente paralela, com 5 hélices de um dos lados da folha β e 7 hélices e uma pequena folha β (com duas cadeias β) antiparalela do outro lado. O domínio III apresenta uma topologia *sandwich* α - β - α (hélice-folha-hélice) e possui uma folha β (com 5 cadeias β) paralela com 6 hélices de um dos lados da hélice e 9 hélices e uma pequena folha β antiparalela (2 cadeias β) do lado oposto. O domínio IV apresenta uma topologia de barril β , constituído por 6 cadeias β flanqueadas por hélices α (Ellis *et al.*, 2001; Warellow *et al.*, 2013).

A proteína apresenta ainda um canal de solvente altamente polar que está presente desde o topo da estrutura até ao centro ativo, ligado pelos domínios I, II e III. A superfície deste canal é maioritariamente formada por resíduos carregados e/ou polares como serina, aspartato, asparagina, glutamato, lisina, histidina, arginina e tirosina.

Na base do canal existem vários resíduos hidrofílicos (His199, Asn200, Arg201, Glu207, Arg447 e His451) que constituem a segunda esfera de coordenação do átomo de Mo e desempenham um papel importante no controlo do reconhecimento e orientação de As(III) (Figura 1.9) (Warellow *et al.*, 2013).

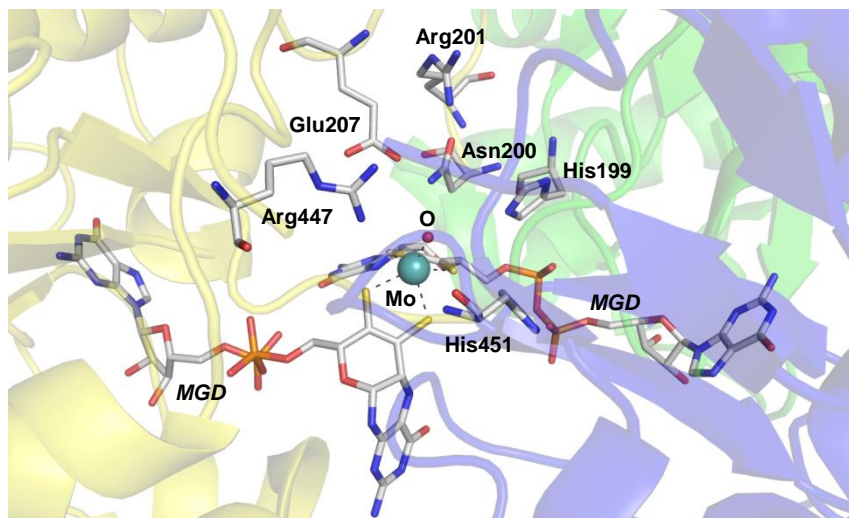


Figura 1.9. Centro ativo da Aio, constituído pelo átomo de molibdénio coordenado por um cofator bis-*MGD* e um átomo de oxigénio, e resíduos His199, Asn200, Arg201, Glu207, Arg447 e His 451 presentes na base do canal de solvente, ligado pelos domínios I, II e III. Os domínios I, II, e III encontram-se representados a azul, verde e amarelo, respetivamente. Código de cores: enxofre – amarelo; carbono – cinzento; molibdénio – azul esverdeado; fósforo – laranja; oxigénio – vermelho e azoto – azul A imagem foi gerada no programa Pymol (Delano, 2002).

No espaço existente entre os quatro domínios da subunidade maior (AioA) estão posicionados dois centros *MGD* (do inglês *Molybdopterin Guanine Dinucleotide*) estabilizados por uma complexa rede de ligações de hidrogénio e pontes salinas (Ellis *et al.*, 2001).

O átomo de molibdénio é coordenado de forma semelhante à observada em outros membros da família dimetilsulfóxido redutase: através de duas moléculas de molibdopterina, cada uma fornecendo uma fração *cis*-ditioleno e de um quinto ligando, modelado como um átomo de oxigénio (a cerca de 1,6 Å do átomo de molibdénio) completando uma geometria quadrangular piramidal (Figura 1.10) (Ellis *et al.*, 2001; Warellow *et al.*, 2013).

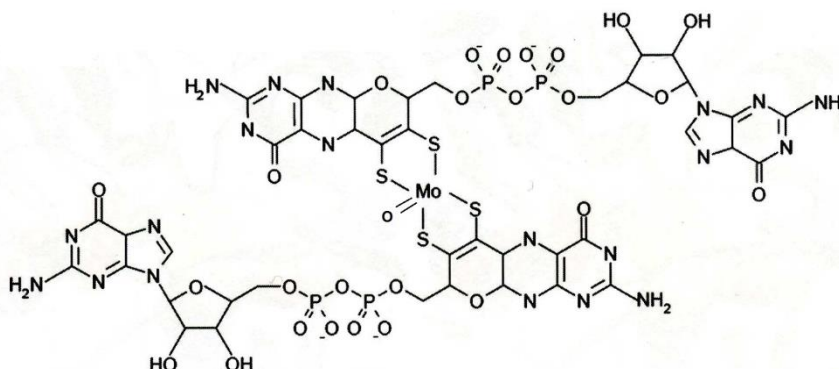


Figura 1.10. Geometria quadrangular piramidal do átomo de Mo do centro ativo, coordenado por um cofator de molibdopterina na forma de duas moléculas de *MGD* (do inglês molybdopterin guanine dinucleotide) e um ligando oxo (Adaptado de Ellis *et al.*, 2001).

1.3.1.2. Subunidade de Rieske (AioB)

A pequena subunidade de Rieske possui 134 aminoácidos e é constituída por dois subdomínios que contêm essencialmente folhas- β . O primeiro domínio apresenta-se na forma de barril β , constituído por seis cadeias β antiparalelas, e o segundo domínio consiste numa folha β , constituída por 4 cadeias β antiparalelas, que se liga ao centro de Rieske [2Fe-2S] (Ellis *et al.*, 2001; Warelou *et al.*, 2013).

O enrolamento global é semelhante ao de outras subunidades que contêm centros de Rieske, como citocromos b_6f e bc_1 e dioxigenases. Um motivo Cys-X-His-X_n-Cys-X₂-His (Cys103-X-His105-X₁₅-Cys121-X₂-His124 em NT-26), também observado para outras proteínas, liga o centro de Rieske [2Fe-2S].

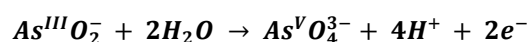
De forma semelhante ao observado para o centro [3Fe-4S], presente na subunidade AioA, a presença de dois resíduos de histidina, em oposição a resíduos de cisteína, aos quais um dos átomos de ferro se coordena, no motivo de ligação ao centro, conduz à formação de um centro de Rieske em vez de um centro [2Fe-2S] (Kurusu *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 1997; Ferrano *et al.*, 2005).

Na extremidade N-terminal da subunidade de Rieske encontra-se a sequência peptídica sinal TAT *leader*, Arg12-Arg13-X-Phe15-Lys16. Esta sequência conservada (R-R-X-F-L), reconhecida pela maquinaria de translocase, é necessária para o transporte da arsenito oxidase, na forma de complexo proteico totalmente enrolado, do citoplasma para o periplasma através da via TAT (do inglês *Twin Arginine Translocation*).

A via TAT é bem conhecida em *Escherichia coli*, sabendo-se que existem vários *chaperones* que participam no enrolamento da apo-proteína e na ligação de cofatores para coordenar a sua inserção. Para substratos complexos como a Aio, que possui múltiplos cofatores e existe em configurações heterodiméricas, pensa-se que devam existir vários passos de controlo em diferentes estágios antes de ocorrer interação com a maquinaria de translocase. Adicionalmente, pensa-se que a sequência Tat *leader* encontrada na região N-terminal da subunidade AioB possa ser responsável pela ancoragem da mesma à membrana em algumas circunstâncias (Lieutaud *et al.*, 2010).

1.3.2. Via de transporte eletrónico

A enzima Aio catalisa a oxidação de As(III) a As(V) de acordo com a reação apresentada de seguida:



A oxidação de As(III) provoca a redução do átomo de molibdénio (alteração do estado de oxidação de +VI para +IV), libertando dois eletrões que se pensa serem transferidos do centro ativo de Mo de acordo com a seguinte sequência: $Mo \rightarrow [3Fe - 4S] \rightarrow [2Fe - 2S]$, representando o mecanismo de reação proposto na Figura 1.11.

Posteriormente, os elétrons são transferidos do centro de Rieske para um aceitador de elétrons fisiológico, azurina ou citocromo c, e, por último, em condições aeróbias, para uma citocromo oxidase, ocorrendo redução de oxigênio a água. Em alguns organismos, a atividade da Aio também está relacionada com a redução de clorato (ClO_3^-), bem como ao processo de fotossíntese (Anderson *et al.*, 1992; Lebrun *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010; vanden Hoven & Santini, 2004).

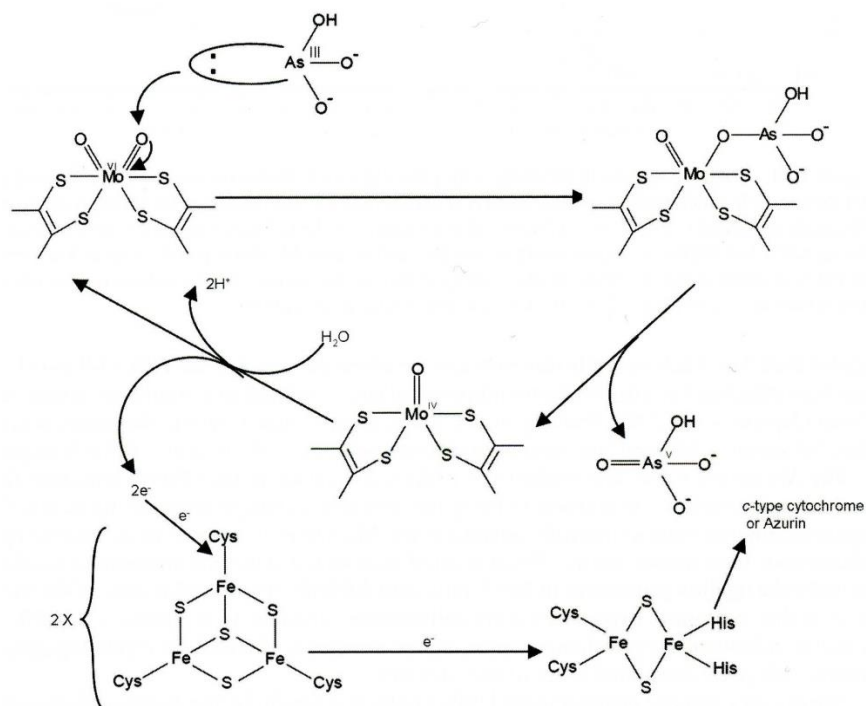


Figura 1.11. Mecanismo de reação proposto para a arsenito oxidase. O grupo oxo de maior ligação é sujeito a ataque nucleofílico pelo par de elétrons proveniente da oxidação de arsenito. As(III) é oxidado a As(V) , reduzindo o átomo de molibdênio de um estado de oxidação +VI para +IV. A reação de hidrólise restaura o estado de oxidação do átomo de molibdênio para +VI e os dois elétrons são transferidos para o centro $[3\text{Fe-4S}]$, de seguida para o centro de Rieske, e por último, para um aceitador de elétrons solúvel como citocromo-c ou azurina (Adaptado de Ellis *et al.*, 2001).

O *turnover* da arsenito oxidase ocorre através de cinética de duplo deslocamento (“ping-pong”), no qual a enzima transita entre as formas oxidada e reduzida. Dado que o arsenito é um substrato dador de dois elétrons, pensa-se que o *turnover* catalítico se inicie com a sua oxidação no centro de Mo, que pode aceitar até dois elétrons.

Os elétrons são então transferidos individualmente para os restantes centros metálicos, de acordo com o mecanismo referido anteriormente, e o arsenato é libertado antes de o aceitador final de elétrons se ligar à proteína na forma reduzida, tornando-se possível realizar estudos de atividade enzimática através monitorização da redução do aceitador de elétrons, utilizando geralmente DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), um aceitador de elétrons não-fisiológico (Anderson *et al.*, 1992; Santini & vanden Hoven, 2004; vanden Hoven & Santini, 2004).

Adicionalmente, pensa-se que a transferência eletrônica seja mediada por uma rede complexa de interações covalentes e pontes de hidrogénio entre o anel pirazina do cofator de pterina e os centros Fe-S.

Posto isto, a compreensão do papel desempenhado por determinados resíduos, na vizinhança do centro ativo e dos centros de Fe-S, no mecanismo de transferência eletrônica, bem como na possível interação/ligação de pequenas proteínas globulares, é essencial para um melhor esclarecimento do mecanismo de ação da arsenito oxidase, tornando-se interessante desenvolver estudos de mutagênese para caracterizar estas interações.

1.3.3. Comparação com estruturas de outras molibdoenzimas

A identidade de sequência entre a Aio de NT-26 e outros membros da família dimetilsulfóxido redutase é relativamente baixa, apresentado um valor de ~26%. No entanto, a topologia global dos domínios individuais da subunidade- α da Aio é semelhante à correspondente de outros membros desta família (Ellis *et al.*, 2001).

As relações estruturais das duas subunidades da Aio são mutuamente exclusivas, na medida em que nenhuma outra proteína com uma subunidade de Rieske, estudada até à data, contém uma subunidade de molibdopterina.

No entanto, a diferença mais significativa entre a Aio e outras molibdoenzimas é a ausência de um ligando adicional, observado em outros membros da família dimetilsulfóxido redutase, na forma de ligação covalente com a cadeia lateral de aminoácidos de cisteína, selenocisteína, ácido aspártico ou serina. Como resultado, o centro ativo de molibdénio torna-se mais exposto, fazendo com que o mesmo se torne incapaz de formar qualquer tipo de ligação covalente. Consequentemente, a Aio representa o quinto subgrupo da família dimetilsulfóxido redutase, apresentando duas moléculas orgânicas de pterina equivalentes a coordenar o átomo de Mo. Os outros quatro subgrupos da família dimetilsulfóxido redutase contêm resíduos de serina, cisteína, selenocisteína ou ácido aspártico que atuam como ligandos da proteína ao metal. De facto, a coordenação global é mais semelhante à apresentada por enzimas que contêm tungsténio, as quais também possuem duas moléculas de pterina, ausência de ligandos polipeptídicos e uma coordenação díoxo proposta para a enzima na forma oxidada (Ellis *et al.*, 2001; Romão, 2009).

Como referido anteriormente, até à data existe uma única estrutura tridimensional da arsenito oxidase de *α -proteobacterium Rhizobium*, sp. NT-26 depositada no *Protein Data Bank*. No sentido de tentar esclarecer o mecanismo de ação da enzima deste organismo, a utilização da técnica de cristalografia de raios-X revela-se fundamental, sendo esta metodologia abordada no capítulo seguinte.

1.4. Cristalografia de raios-X

A cristalografia de raios-X é uma técnica utilizada para a determinação da estrutura tridimensional de moléculas.

Estudos nesta área têm permitido compreender melhor os princípios básicos da arquitetura das proteínas, ao fornecer informação detalhada sobre a sua atividade, mecanismos de reconhecimento e ligação a substratos e inibidores, e possíveis alterações conformacionais.

O conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas tem ainda sido relevante para compreender as relações entre sequência primária, estrutura e função, com especial interesse para as indústrias química e farmacêutica (Blow, 2002; Romão, 1996).

Comparativamente com outras técnicas utilizadas na determinação experimental de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas, como espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Microscopia Eletrónica a temperaturas criogénicas (crio-EM), a cristalografia de raios-X é uma técnica vantajosa na medida em que não apresenta limitações de tamanho da moléculas a estudar e fornece um detalhe atómico muito preciso (Huilin *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2012).

O princípio da cristalografia de raios-X baseia-se na formação de cristais de macromoléculas biológicas, pelo que a determinação de uma estrutura tridimensional através desta está dependente da existência e da ordem interna de monocristais. Os principais passos envolvidos na resolução de estrutura de proteínas por cristalografia de raios-X (Figura 1.12) passam pelo isolamento e purificação da proteína, a sua cristalização de forma adequada à recolha de dados de difração, na qual é incidido um intenso feixe de raios-X que interage com os eletrões dos átomos dos cristais, o processamento destes dados e o cálculo de um mapa de densidade eletrónica, que com auxílio de variados programas informáticos, permite a construção de um modelo molecular (Gale, 2006; Mattsson, 2011).

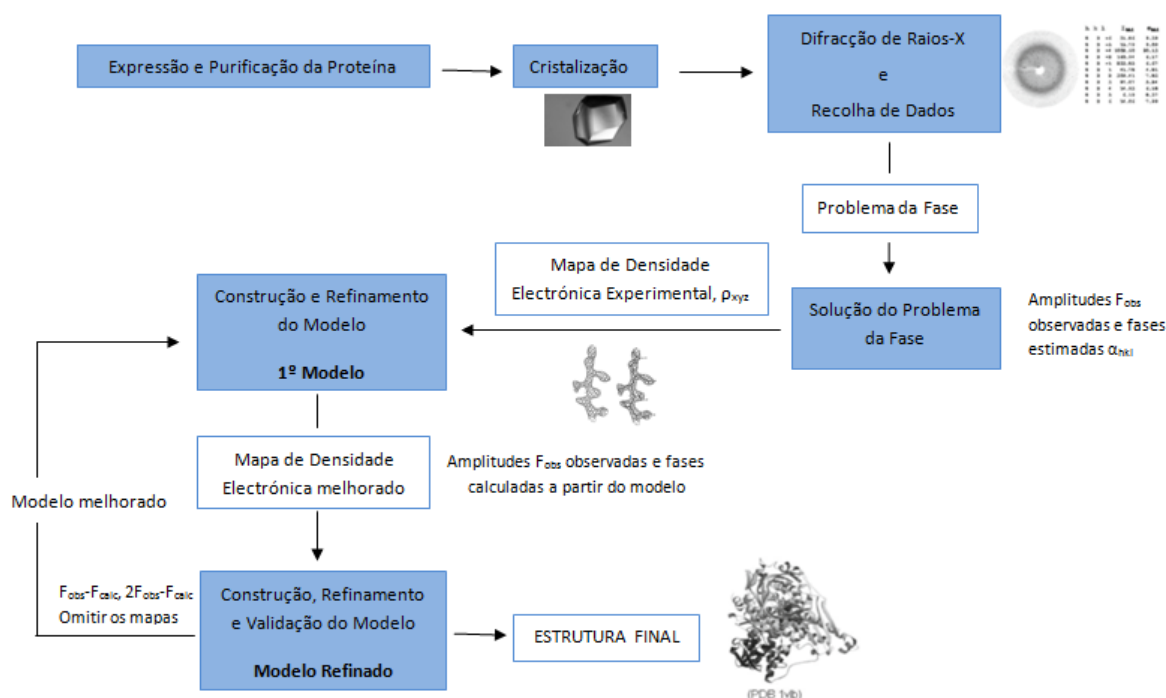


Figura 1.12. Principais etapas envolvidas na determinação de estruturas tridimensionais (3D) de macromoléculas biológicas, por cristalografia de raios-X. (Adaptado de Carvalho *et al.*, 2009).

1.4.1. Cristalização de proteínas: conceitos básicos

Perante determinadas circunstâncias, muitas substâncias moleculares, incluindo proteínas, podem solidificar originando cristais. Ao passar ao estado cristalino a partir da solução, as moléculas individuais da substância adotam uma ou algumas orientações idênticas. O cristal resultante corresponde a uma matriz tridimensional ordenada de moléculas, unidas por interações não covalentes, nomeadamente pontes de hidrogénio, entre os átomos que se encontram à superfície da molécula. Nessa matriz é possível identificar a célula unitária, que se define como a menor unidade do cristal que se repete infinitamente no espaço tridimensional, originando um cristal ordenado. Esta célula é caracterizada por 3 vetores, definidos por **a**, **b** e **c**, e por 3 ângulos definidos por α , β e γ (Figura 1.13) (Gale, 2006; Romão, 1996).

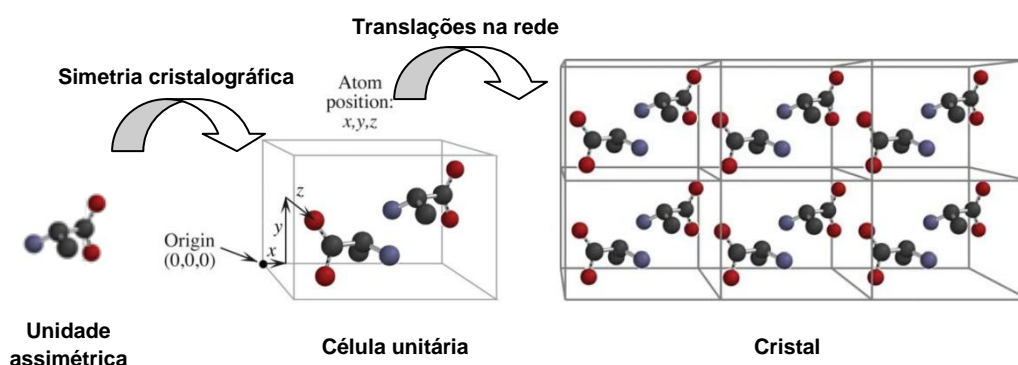


Figura 1.13. Representação esquemática de um cristal. Por operações de simetria, a unidade assimétrica gera a célula unitária que, por sua vez, através de operações de translação, gera a rede cristalina, que se repete de forma ordenada no espaço tridimensional (Adaptado de Gale, 2006).

A célula unitária é, por sua vez, constituída por uma ou mais unidades assimétricas, que representam a menor parte da estrutura cristalina, a partir da qual se pode obter a célula unitária, através da aplicação de operações de simetria. Por último, define-se o conceito de rede cristalina, cuja base é uma célula unitária que se repete em todos os pontos dessa rede (Gale, 2006).

O grupo espacial a que um cristal pertence corresponde ao conjunto de operações de simetria cristalográfica que originam a célula unitária a partir da unidade assimétrica. A caracterização do grupo espacial do cristal é feita de acordo com três parâmetros: geometria da célula unitária, número de pontos da rede cristalina na célula unitária e pelas operações de simetria que, ao serem aplicadas a uma unidade assimétrica, geram a célula unitária (Gale 2006; Romão 1996).

Consoante os valores das constantes da célula, o cristal pode pertencer a um de sete sistemas cristalinos existentes: cúbico, trigonal, tetragonal, hexagonal, ortorrômbico, monoclinico e triclínico (consultar Anexo 2, Figura 7.2).

No que diz respeito ao número de pontos da rede cristalina, a célula unitária pode ser do tipo: Primitivo (P) quando apenas um ponto da rede está presente na célula unitária, centrado numa única face (C) ou centrado no corpo (I) quando existem dois pontos da rede cristalina pertencentes à célula unitária ou centrado nas seis faces (F) quando 4 pontos da rede cristalina estão presentes na célula unitária (Gale, 2006).

A combinação da geometria da célula unitária, isto é do sistema cristalino, e do número de pontos da rede cristalina na célula unitária origina a chamada rede *Bravais*, existindo 14 redes *Bravais* (consultar Anexo 2, Figura 7.3).

Por último, no que diz respeito à caracterização do grupo espacial, torna-se necessário referir as operações de simetria cristalográfica que, aplicadas à unidade assimétrica, originam a célula unitária, encontrando-se descritas nas tabelas internacionais para cristalografia. Estas operações podem ser do tipo rotacional ou de eixo de parafuso, sendo que nestas últimas para além de rotação, ocorre também translação da unidade assimétrica de forma a originar a célula unitária (Blow, 2002; Gale 2006).

No que diz respeito a moléculas aquirais, ou seja, moléculas cuja imagem no espelho pode ser sobreposta à imagem original, verificam-se também operações de simetria como o plano de espelho ou o centro de inversão. Neste caso, a combinação da geometria da célula unitária com o número de pontos da rede cristalina na célula unitária e as operações de simetria origina um conjunto total de 230 grupos espaciais. No entanto, dado que moléculas biológicas, como as proteínas, são inerentemente quirais, isto é, a sua imagem do espelho não pode ser sobreposta à imagem original, estas não apresentam as duas referidas operações de simetria, reduzindo para 65 o número de grupos espaciais a que os cristais de proteína podem pertencer (Blow, 2002; Gale 2006).

Como referido anteriormente, o sucesso da determinação de estruturas tridimensionais pela técnica de cristalografia de raios-X depende do desenvolvimento e obtenção de bons cristais e consequentemente da sua organização interna (Blow, 2002).

Deste modo, é essencial encontrar determinadas condições que permitam uma organização regular das proteínas, formando cristais, metodologia designada por *screening*.

Para tal, é necessário variar um grande número de condições experimentais, nomeadamente pH, tipo e concentração de agente precipitante e temperatura. A escolha das experiências mais adequadas deve considerar vários fatores, entre os quais o protocolo de purificação, comportamento da proteína e o seu ponto isoelétrico (Carvalho *et al.*, 2009).

A estratégia utilizada para induzir a cristalização de macromoléculas baseia-se em atingir lentamente um estado de solubilidade mínima de modo a alcançar um determinado grau de sobressaturação que facilite o ordenamento das moléculas numa rede cristalina.

Nos métodos mais comuns de crescimento de cristais de proteína, a proteína purificada é dissolvida num tampão aquoso que contém um agente precipitante (sendo o sulfato de amônio e o polietilenoglicol (PEG) os mais comuns), a uma determinada concentração, imediatamente abaixo da concentração necessária para precipitar a proteína. Quando a água é eliminada por um processo de evaporação controlado, verifica-se um aumento das concentrações de proteína e agente precipitante, resultando na precipitação da proteína. A precipitação lenta produz cristais de maiores dimensões, ao invés de um processo de precipitação mais rápido cujo resultado pode ser a formação de cristais mais pequenos ou a formação de um precipitado amorfo (Gale, 2006).

Teoricamente, a precipitação deve ocorrer quando a combinação entre as concentrações de proteína e precipitante excede os valores limiares de solubilidade (Figura 1.14). A formação de cristais ocorre em dois estágios: a nucleação, em que se verifica um processo de precipitação lento de forma a favorecer a formação inicial de agregados proteicos, e o crescimento de cristais, sendo este último verificado aquando da entrada na região metaestável (Carvalho *et al.*, 2009; Romão 1996).

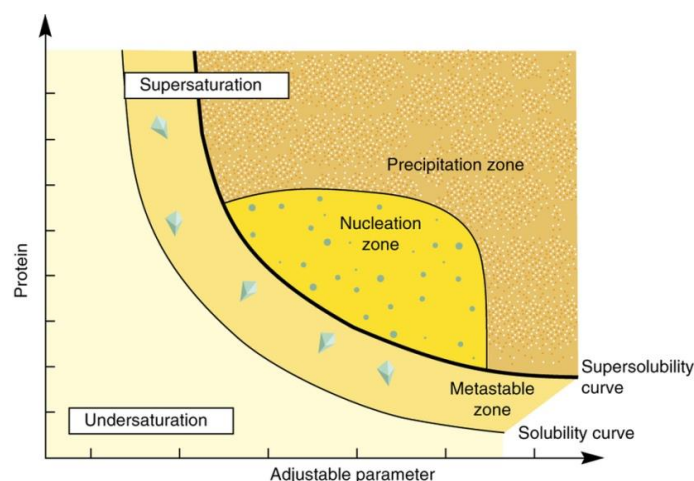


Figura 1.14. Diagrama de fases para o processo de cristalização de proteínas. O parâmetro ajustável pode incluir: concentração de agente precipitante, pH e temperatura, entre outros. No diagrama são apresentadas duas regiões distintas: a região não saturada e a região sobressaturada, que inclui a zonas de nucleação, na qual ocorre formação de núcleos de cristalização, a zona metaestável, onde ocorre crescimento de cristais e a zona de precipitação (Adaptado de Gale, 2006).

Existem vários métodos que podem ser utilizados nos ensaios de cristalização, entre os quais a Difusão por Capilar, cristalização em *Batch* ou Microdiálise, mas o método mais comum é o de Difusão de Vapor.

O método de Difusão de Vapor tem como princípio básico estabelecer um equilíbrio, num recipiente fechado, entre uma gota de solução de proteína e solução precipitante, e um reservatório que contém solução precipitante, cuja concentração é ótima para a produção de cristais. Como a concentração de precipitante é superior no reservatório e como se trata de um sistema fechado, a tendência para igualar a concentração de precipitante na gota e no reservatório provoca a difusão de vapor com transferência de água da solução de proteína para o reservatório.

Assim, a concentração de proteína, presente na gota, aumenta até atingir um valor de concentração ótimo para a formação de cristais. O mesmo sucede com a concentração de precipitante.

Quando o equilíbrio é atingido, pode formar-se um precipitado amorfo ou microcristalino, ou em condições mais favoráveis material cristalino. Geralmente, após a realização de um conjunto de ensaios de cristalização é necessário otimizar determinados parâmetros como pH, temperatura, concentração de agente precipitante, uso de aditivos ou *seeding*, com objetivo de otimizar as condições preliminares, até que se obtenham cristais de boa qualidade e de dimensões que permitam a sua manipulação e difração ($\geq 0,05\text{mm}$) (Gale 2006; Romão, 1996).

Este método inclui a técnica de gota suspensa, onde a gota é colocada numa lamela situada sobre o reservatório, e o método de gota assente, em que a gota é colocada numa microponte localizada no reservatório, como se encontra ilustrado na Figura 1.15.

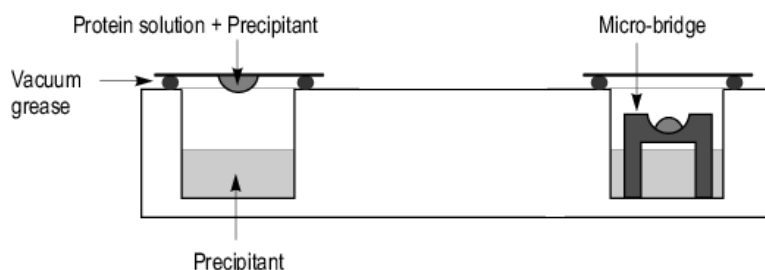


Figura 1.15. Técnicas de cristalização por difusão de vapor: técnica de gota suspensa (representada à esquerda) normalmente utilizada para os ensaios de cristalização realizados manualmente e técnica de gota assente (representada à direita) geralmente utilizada em ensaios realizados no dispensador automático de gotas (*robot*) (Adaptado de Gale, 2006).

Após a obtenção de cristais o passo que se segue é a experiência de difração, que consiste em incidir um feixe de raios-X no cristal.

1.4.2. Difração de raios-X e Resolução da estrutura

Os raios-X, descobertos pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, são radiação eletromagnética, cujo comprimento de onda (λ) se situa entre os 0,1 e os 100 Å. Existem várias fontes utilizadas na produção de raios-X, entre as quais, o ânodo rotativo que funciona através do bombardeamento de um metal, como cobre, com eletrões que são acelerados por um campo elétrico. Os raios-X são emitidos quando os eletrões transitam de uma orbital energética externa para uma orbital interna livre, possuindo o comprimento de onda característico do metal.

Outra fonte de produção de raios-X são os tubos de microfoco como I μ S (do inglês *Incoatec Microfocus Source*), cujo princípio de funcionamento é semelhante ao ânodo rotativo mas o ponto focal do feixe de eletrões do ânodo tem um diâmetro reduzido de 20-50 μm , revelando-se uma fonte de elevada intensidade de produção de raios-X *in house*.

No entanto, o Sincrotrão é a fonte mais poderosa para produzir raios-X. O Sincrotrão é um acelerador de partículas, com forma de anel, no qual os elétrons circulam a elevadas velocidades e perdem energia sob a forma de radiação de raios-X. Uma vez que a radiação de sincrotrão é muito intensa e sintonizável, o Sincrotrão apresenta vantagens no sentido em que melhora a qualidade e rapidez da recolha de dados, sendo também útil na resolução do Problema da Fase (Carvalho *et al.*, 2009).

Depois de se terem obtido cristais da proteína de interesse, segue-se a experiência de difração e recolha dos dados. Tal consegue-se ao incidir um feixe de raios-X no cristal originando um padrão de difração, de acordo com a organização interna do cristal, que resulta da interação da radiação com os elétrons dos átomos presentes. Os raios-X sofrem dispersão em todas as direções, provocada pelos átomos do cristal, mas, apenas as interferências construtivas (de acordo com a Lei de Bragg) produzem o padrão de difração que é registado num detetor sob a forma de reflexões (Carvalho *et al.*, 2009).

Quando o cristal é exposto a feixes de radiação de alta intensidade pode sofrer deterioração. A fim de minimizar os efeitos causados pela radiação a experiência de difração é feita na presença de uma corrente de azoto gasoso de forma a que o conjunto de dados seja recolhido a cerca de 100 K. Utiliza-se também uma solução crio-protetora, que contém agentes como glicerol ou paratona, que evita a formação de cristais de gelo no interior da rede cristalina, reduzindo a dispersão de raios-X pelas moléculas de água.

Deste modo, os cristais devem ser transferidos para a solução crio-protetora e de seguida congelados em azoto líquido sendo depois expostos aos feixes de raios-X (Carvalho *et al.*, 2009; Gale, 2006).

O fenómeno de difração de raios-X foi explicado por Lawrence L. Bragg que demonstrou que, durante a experiência de difração, os átomos constituintes da molécula dispersam a radiação de forma aleatória. No entanto, existem direções preferenciais onde se regista interferência construtiva entre as ondas que são difratadas pelo cristal e que originam reflexões (resultantes da contribuição de todos os átomos com o mesmo ângulo de difração) que constituem o padrão de difração (Carvalho *et al.*, 2009; Romão, 1996; Wlodawer *et al.*, 2008).

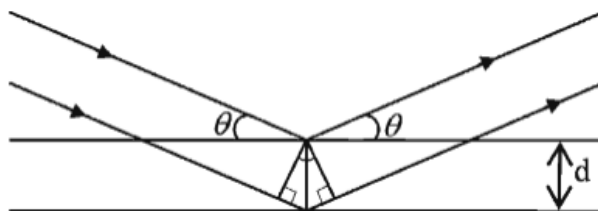


Figura 1.16. Representação esquemática da Lei de Bragg (Adaptado de Gale, 2006).

A lei de Bragg, representada esquematicamente na Figura 1.16, permite prever quando a interferência da radiação é construtiva. Para um espaço interplanar (d) e um ângulo incidente (θ), as ondas difratadas somam-se (interferência construtiva) apenas quando a diferença de distância percorrida por estas for igual a um múltiplo do comprimento de onda do feixe de raios-X. Este fenómeno é descrito pela seguinte equação:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta)$$

Segundo Bragg, pode-se imaginar que as reflexões provêm de espelhos que passam por pontos de rede do cristal, a que se chamam planos de difração. Estes planos são identificados através de três índices hkl , denominados por índices de *Miller* (Blow, 2002; Gale, 2006).

Como referido anteriormente, cada reflexão corresponde a um feixe de raios-X que é difratado pelo cristal quando se verifica interferência construtiva. As reflexões são tratadas como ondas e caracterizadas por três grandezas: amplitude (F), α (fase) e λ (comprimento de onda) (Blow, 2002).

Através da relação inversa entre o espaço de células unitárias no cristal, designado por rede cristalina, e o espaçamento das reflexões no detetor, designado por rede recíproca, é possível determinar no cristal (espaço real) a posição dos átomos na célula unitária. A posição de um átomo na célula unitária pode ser definida por um conjunto de coordenadas cartesianas espaciais (x , y e z), mas no padrão de difracção, correspondente ao espaço recíproco, a posição das reflexões é determinada pelos índices de Miller (h, k, l), como é possível visualizar na Figura 1.17 (Blow, 2002; Gale, 2006).

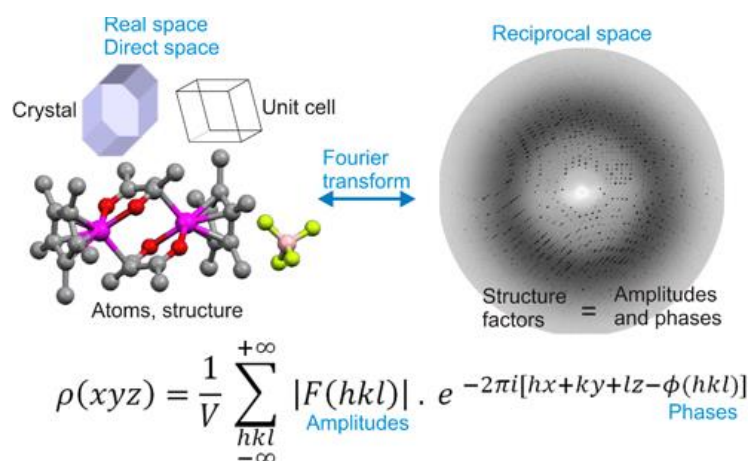


Figura 1.17. Representação esquemática da experiência de difração de raios-X. Quando o feixe de radiação incide sobre o cristal são produzidas reflexões individuais no detetor dando origem a um padrão de difração (Adaptado de Gale, 2006).

Assim sendo, as reflexões podem ser descritas como uma série de Fourier (FT) através da equação dos fatores de estrutura (F_{hkl}), apresentada de seguida.

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{[2\pi i(hx + ky + lz)]} dV$$

$\begin{array}{c} \downarrow \text{FT}^{-1} \quad \uparrow \text{FT} \\ \rho(x, y, z) = \sum_{h,k,l} |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})} \end{array}$

A partir dos fatores de estrutura F_{hkl} é possível calcular um mapa de densidade eletrónica (ρ_{xyz}). A análise deste mapa possibilita a identificação da localização de cada átomo na célula unitária, permitindo determinar as suas coordenadas atómicas (x,y,z) no espaço tridimensional (Romão, 1996; Wlodawer *et al.*, 2008).

Contudo, a experiência de difração fornece apenas informação da amplitude das ondas difratadas, pelas intensidades medidas, mas toda a informação da fase (α_{hkl}) é perdida. Assim, a distribuição de densidade eletrónica, e consequentemente a estrutura 3D, não podem ser diretamente calculadas, e as fases têm de ser determinadas indiretamente, surgindo o chamado Problema da Fase em cristalografia (Carvalho *et al.*, 2009).

Existem várias metodologias utilizadas para a resolução deste problema que permitem obter informação das fases, ainda que esta seja aproximada, nomeadamente os métodos de:

- Substituição Molecular (MR – *Molecular Replacement*),
- Substituição Isomórfica Múltipla (MIR – *Multiple Isomorphous Replacement*),
- Dispersão Anómala Simples ou Múltipla (SAD/MAD – *Single/Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*).

Os métodos de MIR, SAD e MAD são aplicados quando a estrutura é desconhecida e não se dispõe de um modelo estrutural, enquanto que o método de MR é utilizado quando existe uma estrutura homóloga àquela que pretendemos estudar, tendo sido este último o método utilizado na presente dissertação.

O método da Substituição Isomórfica Múltipla (MIR) é geralmente conseguido pela incubação de cristais derivatizados com átomos pesados, que interagem com as cadeias laterais dos aminoácidos provocando variações nas intensidades de difração. A diferença das amplitudes dos dados nativos e dos derivados isomórficos permite determinar a posição dos átomos pesados, o que torna possível a determinação de fases e obtenção de um mapa de densidade eletrónica (Carvalho *et al.*, 2009).

Os métodos de Dispersão Anômala, que também recorrem à utilização de átomos pesados, baseiam-se na detecção de dispersão anômala dos raios-X em função do comprimento de onda do átomo em questão. A dispersão anômala resulta da absorção de raios-X pelos elétrons dos átomos pesados, induzindo a variação da intensidade de difração, o que permite a estimativa das fases iniciais (Carvalho *et al.*, 2009).

Se a detecção do efeito anômalo for realizada a um único comprimento de onda, o método utilizado é o de Dispersão Anômala Simples (SAD), enquanto que no método de Dispersão Anômala Múltipla (MAD) são efetuadas medições a diferentes comprimentos de onda.

Como referido anteriormente, quando existem estruturas resolvidas de proteínas homólogas, o método utilizado é o de Substituição Molecular, que se baseia na determinação matemática da posição correta do modelo da proteína homóloga na célula unitária da proteína de estudo. O posicionamento é conseguido através de duas funções, denominadas por funções de rotação e translação.

A função de rotação é utilizada com objetivo de orientar corretamente o modelo na célula unitária, que se consegue pela sobreposição dos mapas de *Patterson* da estrutura e do modelo. O método de Patterson é um método utilizado na determinação de estruturas (obtenção das fases preliminares) que se baseia no cálculo de séries de Fourier, utilizando como coeficiente o módulo dos fatores de estrutura ao quadrado ($|F_{hkl}|^2$), sendo obtido como resultado um conjunto de vetores interatômicos que permite o conhecimento da posição aproximada dos átomos, relativamente à célula unitária (Blow, 2002; Gale, 2006).

De seguida, através da função de translação, determina-se a posição correta do modelo, por comparação dos fatores de estrutura calculados (F_{calc}) com os obtidos experimentalmente (F_{obs}). Depois de encontrada a melhor posição e orientação do modelo utilizam-se as fases calculadas do modelo, α_{calc} , para obter o mapa de densidade eletrónica inicial (Blow, 2002; Gale, 2006).

1.4.3. Construção do modelo, Refinamento e Validação

Depois de se obter uma aproximação das fases por qualquer um dos métodos referidos anteriormente procede-se à obtenção de um mapa de densidade eletrónica, tendo por base informação acerca da sequência de aminoácidos da proteína (Romão, 1996).

O mapa, por sua vez, pode ser otimizado através da construção do modelo e do cálculo de novas fases através de novas Transformadas de Fourier (FT). Este processo leva a uma melhoria das fases, e consequentemente da densidade eletrónica, permitindo geralmente a obtenção de um modelo que explica convenientemente os dados experimentais.

Neste processo iterativo, o modelo sofre alterações que permitem minimizar as diferenças entre as amplitudes observadas ($|F_{obs}|$) e as amplitudes calculadas ($|F_{calc}|$).

A qualidade do refinamento pode então ser avaliada pelo fator R, um parâmetro que traduz o grau de concordância entre o modelo construído e os dados experimentalmente obtidos:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

O valor de R deverá ser o menor possível de modo a demonstrar a proximidade entre as amplitudes calculadas e observadas. Para estruturas de alta resolução espera-se um valor de R inferior a 20%. Na presença de valores superiores, revela-se importante examinar cuidadosamente o modelo, uma vez que podem ter ocorrido erros importantes durante sua construção e refinamento.

Outro parâmetro, igualmente importante, é o R_{free} que é determinado de forma semelhante ao fator R, mas utiliza uma fração de dados (5-10%) que são excluídos do processo de refinamento. A comparação do fator R e do R_{free} é importante, na medida em que esta pode indicar problemas de interpretação do modelo. Se o fator R diminuir, mas o R_{free} não acompanhar a tendência podemos estar na presença de uma sobre-interpretação do mapa. Deste modo, espera-se, para dados de alta resolução, que a diferença entre o fator R e o R_{free} não deva exceder os 5% (Carvalho *et al.*, 2009; Romão, 1996; Wlodawer *et al.*, 2008).

Existem ainda outros parâmetros a considerar, como o fator B (em Å²), relacionado com a vibração térmica de um átomo numa dada posição, que permite detetar erros locais no modelo, uma vez que, quando um átomo se encontra mal posicionado, este apresenta um fator B muito superior comparativamente aos átomos que o rodeiam. Adicionalmente, átomos encontrados na superfície da proteína e em zonas com maior mobilidade possuem geralmente valores de fator B superiores aos encontrados no interior na mesma.

Adicionalmente, o diagrama de *Ramachandran* permite analisar o modelo do ponto de vista estereoquímico, pois fornece informação sobre as conformações permitidas para os aminoácidos, tendo em conta a conformação do par de ângulos diedros em torno do Cα, φ e Ψ, na densidade para a qual se encontram ajustados (Gale, 2006; Wlodawer *et al.*, 2008). Por último, o RMSD (do inglês *Root-mean-square deviation*) permite avaliar o desvio de parâmetros geométricos do modelo, como comprimento e ângulos de ligação, face a valores teóricos definidos. Para um modelo bem refinado, os valores de RMSD para os comprimentos de ligação e para os ângulos de ligação, deve encontra-se abaixo de 0,02 Å e 3°, respetivamente.

Uma vez concluído o processo de refinamento, procede-se à validação, onde se recorrem a diversos critérios que permitem avaliar os resultados de análise estrutural. Neste passo, podem ser feitos alguns ajustes finais para que o modelo final possa então ser depositado na base de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Wlodawer *et al.*, 2008).

2. Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo contribuir para a clarificação do mecanismo de reação da enzima arsenito oxidase (Aio), de um ponto de vista estrutural. Assim sendo, como alvo deste estudo selecionou-se a molibdoenzima Aio de *Alphaproteobacterium Rhizobium* sp.NT-26, um organismo conhecido pela sua capacidade de catalisar a oxidação de arsenito como mecanismo de resistência a arsénio.

Foram realizados estudos com a proteína nativa e com vários mutantes.

No que diz respeito aos estudos com a proteína nativa pretende-se:

- Caracterizar estruturalmente a interação de compostos análogos ao substrato, através da visualização de estados intermédios de reação no centro ativo da enzima, por cristalografia de raios-X. Para tal, é necessário sobre-expressar em *E. coli* e purificar a proteína, e realizar ensaios de cristalização, com vista à obtenção da estrutura tridimensional. Todos estes passos foram realizados no laboratório de Cristalografia de proteínas do UCIBIO-REQUIMTE, FCT-UNL.

Os estudos com mutantes apresentam como objetivo avaliar o papel desempenhado por resíduos específicos, que se pensa estarem envolvidos no mecanismo de transferência eletrónica desencadeado pela oxidação de arsenito, o que implica:

- Caracterizar estruturalmente os mutantes AioA Q726G e AioB F108A e analisar possíveis alterações induzidas pelas mutações, por cristalografia de raios-X. A concretização deste objetivo intermediário pressupõe a expressão, purificação e cristalização dos mutantes, de forma a possibilitar a obtenção das respetivas estruturas tridimensionais. Estes mutantes foram obtidos anteriormente pela Professora Joanne Santini no Institute of Structural and Molecular Biology da University College of London, com a qual se estabeleceu uma colaboração para a presente dissertação, e as etapas mencionadas foram realizadas no laboratório de Cristalografia de proteínas do UCIBIO-REQUIMTE, FCT-UNL.
- Averiguar o efeito das respetivas mutações na atividade enzimática da arsenito oxidase por espectroscopia de UV-Visível, através da realização de ensaios cinéticos, também estes efetuados no laboratório de Cristalografia de proteínas.
- Realizar mutagénesse dirigida para a obtenção de outros mutantes da subunidade AioA, nomeadamente D169A/N e E453A/Q. Este procedimento foi realizado no Institute of Structural and Molecular Biology sob supervisão e orientação da Professora Joanne Santini.

3. Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais descritos nas secções 3.1 e 3.7 resultaram da colaboração realizada com a Professora Joanne Santini do Institute of Structural and Molecular Biology, University College of London no Reino Unido, onde foi executada a componente de biologia molecular deste trabalho, nomeadamente a escolha da estirpe bacteriana e plasmídeo, clonagem, composição dos meios e condições de crescimento, e realização de mutagenese dirigida.

3.1. Clonagem dos genes *aioBA* de *Rhizobium* sp. NT-26

Os genes *aioB* e *aioA* (*aioBA*) de NT-26 foram amplificados sem a sequência Tat nativa, que codifica os primeiros 40 aminoácidos da subunidade AioB, e clonados, em trabalho anterior pela Professora Joanne Santini, no vetor de expressão pPROEX-Htb (Invitrogen) que contém locais de restrição para as enzimas *EcoRI* e *PstI*. As sequências de oligonucleótidos (*primers*), utilizados para a clonagem dos genes *aioBA*, encontram-se apresentadas de seguida na Tabela 3.1. A informação adicional relativa ao procedimento de clonagem dos genes *aioBA* encontra-se apresentada em Anexo (Figura 7.4) (Warellow *et al.*, 2013).

Tabela 3.1. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *aioB* e *aioA* de NT-26. As sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, encontram-se destacadas nas sequências dos *primers forward* e *reverse*, respetivamente.

| | |
|----------------|--|
| Primer Forward | 5'- GCGAATTC AAGCTACCGCGGCGGCAGGGGTC- 3' |
| Primer Reverse | 5'- GCCTGCGAGTCAAGCCGACTGGTATTCTTTCTGA- 3' |

O constructo utilizado para a expressão dos genes em estudo encontra-se apresentado na Figura 3.1, no qual se verifica a presença de uma cauda de resíduos de histidina na extremidade N-terminal do gene *aioB*.

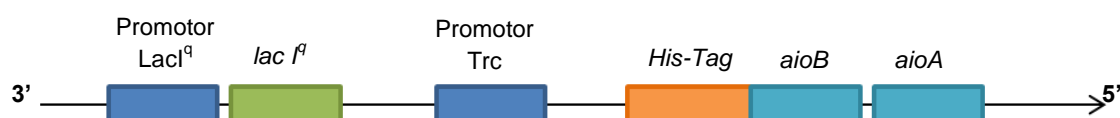


Figura 3.1. Constructo utilizado para expressão dos genes *aioA* e *aioB*. Os genes *aioA* e *aioB* codificam as subunidades AioA e AioB, respetivamente. Os genes são co expressos sobre controlo do promotor Trc, indutível por IPTG. Encontra-se também representada a cauda de resíduos de histidina (His-Tag) presente na extremidade N-terminal do gene *aioB*.

3.2. Expressão Heteróloga da arsenito oxidase de *Rhizobium* sp. NT-26

A expressão da Aio nativa e dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A foi conseguida com recurso a um protocolo descrito pelos colaboradores deste projeto (Warellow *et al.*, 2013).

A transformação de células competentes da estirpe DH5α de *Escherichia coli* com DNA plasmídico foi realizada num ambiente estéril. Tendo em conta o protocolo utilizado, inicialmente foram pipetados 50 µL de células competentes DH5α para dois *eppendorfs*, previamente arrefecidos, a um dos quais se adicionou 1 µL de DNA plasmídico Aio, servindo o outro *eppendorf* como controlo da reação de transformação.

A mistura foi incubada em gelo durante 30 minutos, posteriormente incubada a 42 °C durante 40 segundos e, de seguida, colocada novamente em gelo durante 5 minutos. Terminado este período, adicionou-se a cada *eppendorf* 500 µL de meio de cultura LB e incubou-se durante 1 hora a uma temperatura de 37 °C com agitação a 180 rpm (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-Bio). O produto obtido aquando da transformação foi plaqueado em placas de LB-agar com 100 µg/mL de ampicilina (AMP). As placas foram posteriormente incubadas a uma temperatura de 37 °C durante a noite (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-Bio), tendo depois do aparecimento de colónias transformantes sido armazenadas a uma temperatura de 4 °C.

Aquando da realização da expressão, inicialmente inocularam-se clones provenientes da transformação em 3 mL de meio de cultura LB (consultar Anexo 4, Tabela 7.2) suplementado com 100 µg/mL AMP e o mesmo foi incubado a 37 °C, com agitação a 180 rpm durante 7 horas (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant.bio). Terminado o primeiro período de incubação, foram transferidos 2 mL de cultura para 100 mL de meio de cultura LB (em *erlenmeyers* de 500 mL) suplementado com 100 µg/mL AMP e 0,5 mM de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), procedendo-se de seguida à incubação das culturas a 37 °C com agitação a 180 rpm durante a noite (Shaker Gallenkamp).

No dia seguinte, foi adicionado 25 mL do pré-inóculo a 500 mL de meio de cultura LB (em *erlenmeyers* de 2 L) suplementado com 100 µg/mL AMP, 0,5 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 40 µM IPTG e incubou-se a uma temperatura de 21 °C, com agitação a 180 rpm durante 24 horas. Terminado o período de indução, as culturas foram colocadas em gelo durante 15 minutos e de seguida centrifugadas durante 12 minutos, a uma temperatura de 8 °C e a 6000 rpm (Rotor JA-10, Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi guardado a -20 °C para posterior purificação.

3.3. Purificação da arsenito oxidase de *Rhizobium* sp. NT-26

A purificação da arsenito oxidase nativa e dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A foi conseguida recorrendo a diferentes etapas de purificação, otimizadas anteriormente no Laboratório de Cristalografia de Proteínas, pela Doutora Alexandra Marques, de acordo com as condições experimentais descritas em Warellow *et al.*, 2013.

Os *pellets* provenientes da expressão heteróloga em *Escherichia coli*, foram inicialmente ressuspensos em 30 mL de tampão de ligação (20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole), e de seguida, transferidos para tubos de 50 mL (Nalgene) para centrifugação durante 10 minutos, a uma temperatura de 4 °C e a 10000 rpm (Rotor JA25-50, Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter). As células recolhidas foram ressuspensas em 10 mL de tampão da reação de ligação por grama de células obtido. Posteriormente, procedeu-se à lise celular por sonicação (UP100H/Tip MS7, Hielscher Ultrasonics) tendo para tal sido realizadas 6 passagens com duração de 1 minuto (ciclo= 0,5 e amplitude= 80%) e intervalo de 1 minuto entre cada passagem.

O extrato total obtido foi centrifugado durante 20 minutos, a 4 °C e a 16000 rpm (Rotor JA25-50, Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter) de forma a separar as frações solúvel e insolúvel. De seguida, recolheu-se o sobrenadante, correspondente à fração solúvel, e o mesmo foi colocado em gelo.

3.3.1. Cromatografia de afinidade por iões metálicos e diálise

Uma vez obtida a fração solúvel, procedeu-se à primeira etapa de purificação através da realização de uma cromatografia de afinidade por iões metálicos imobilizados (IMAC do inglês *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*), devido à elevada eficácia deste método para separação de proteínas que possuem caudas de resíduos de histidina.

Para tal, adaptou-se uma coluna de níquel His-TrapTM (GE-Healthcare), previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole), que promove a interação da cauda de histidinas da proteína com os iões de níquel imobilizados na coluna, ao sistema de HPLC AKTA START (GE-Healthcare), tendo utilizado o programa UNICORNTM start 1.0 para determinar os parâmetros e monitorizar o processo de purificação. Primeiramente, o extrato celular foi carregado na coluna a um fluxo de 2 mL/min. De seguida, a coluna foi lavada com 100 mL de tampão de ligação, utilizando um fluxo de 3 mL/min, verificando-se que, depois da passagem deste volume, a absorvância a 280 nm é bastante baixa e não apresenta variações significativas. Posto isto, e após separação dos constituintes que apresentam baixa afinidade para os iões de níquel imobilizados na coluna, procedeu-se à eluição da proteína através do aumento da força iónica, tendo para tal utilizado o tampão de eluição (20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 0,5 M imidazole).

As frações recolhidas foram posteriormente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Para este fim, foi preparado um gel de Tris-Tricina (12,5% de poliacrilamida) no qual foram carregadas amostras de 20 µL (10 µL de amostra e 10 µL de *loading buffer*) previamente aquecidas a uma temperatura de 100 °C durante 5 minutos. Aplicou-se uma corrente de 200 V e 200 mA durante cerca de 45 minutos até se verificar uma boa separação dos componentes do marcador de pesos moleculares (NZY Colour Protein Marker II, NZYTech).

Após análise das frações recolhidas por eletroforese em condições desnaturantes, foram escolhidas as frações que continham as duas subunidades da proteína (AioA e AioB) para clivagem enzimática com *Tobacco Etch Virus* (TEV) e posterior diálise, visando a remoção da cauda de histidinas na subunidade AioB.

Posto isto, adicionou-se 1 mL de TEV 1 mg/mL à fração total de proteína (constituída pelas frações escolhidas após análise por SDS-PAGE) e a mesma foi dialisada numa membrana de 3500 Da durante a noite, a uma temperatura de 4 °C contra tampão de clivagem da TEV (20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,2 M NaCl; 20 mM imidazole, 1 mM EDTA e 1 mM DTT).

3.3.2. Cromatografia de afinidade por íons metálicos e dessalinização

Após diálise com TEV durante a noite, a solução de proteína dialisada foi transferida para *eppendorfs* de 1,5 mL e, de seguida centrifugada durante 10 minutos, a uma temperatura de 4 °C e a 10000 rpm de forma a eliminar qualquer precipitado existente. De seguida, transferiu-se o sobrenadante para um concentrador (Centricon Vivaspin® Turbo 15 de 5kDa, Sartorius) para realizar a troca para o tampão de ligação.

Adaptou-se novamente uma coluna de níquel His-Trap™ (GE-Healthcare), previamente equilibrada com tampão de ligação, ao sistema de HPLC AKTA START (GE-Healthcare). Primeiramente, a solução de proteína foi carregada na coluna a um fluxo de 1 mL/min e iniciou-se a lavagem da coluna com um fluxo de 2 mL/min com tampão de ligação, monitorizando continuamente o aumento da absorvância a 280 nm para proceder à recolha de frações. As frações de proteína que continham as subunidades AioAB foram recolhidas na fase inicial de *flow-trough* e posteriormente concentradas (Centricon Vivaspin® Turbo 15 de 5kDa, Sartorius) em tampão de ligação, realizando sucessivas centrifugações até se atingir um volume inferior a 4,5 mL, para posterior injeção da amostra em três colunas His-Trap Desalting (GE-Healthcare).

Posto isto, adaptaram-se três colunas His-Trap Desalting, conectadas em série e previamente equilibradas numa nova solução tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl) ao sistema de HPLC AKTA START (GE-Healthcare) e utilizou-se novamente o programa UNICORN™ start 1.0. A solução de proteína foi carregada na coluna, utilizando um fluxo de 2 mL/min e recolheram-se as frações de proteína quando se monitorizou um aumento do valor da absorvância a um comprimento de onda de 280 nm.

A realização da etapa de dessalinização, teve como propósito a permuta do tampão de ligação para a solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl, para posterior realização da última etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Após dessalinização, a amostra de proteína foi novamente concentrada (Centricon Vivaspin® Turbo 15 de 5kDa, Sartorius) para um volume final de 500 µL. Por último, a amostra de proteína concentrada foi centrifugada durante 10 minutos, a uma temperatura de 4 °C e 10000 rpm (MiniSpin® Plus, Eppendorf), recolhendo o sobrenadante, que foi guardado durante a noite em gelo a uma temperatura de 4 °C.

3.3.3. Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é um método de purificação que visa a separação de diversos constituintes de uma mistura de acordo com a sua massa molecular.

Aquando da realização da cromatografia de exclusão molecular foi utilizada uma coluna Superdex 200™ 10/300 GL (GE-Healthcare), acoplada ao cromatógrafo *Shimadzu*, tendo utilizado o programa Lab Solutions para delinear o método de purificação, no qual foi sempre aplicada uma pressão inferior a 2.0MPa.

A coluna Superdex 200TM 10/300 GL foi inicialmente lavada com cerca de 100 mL de água Milli-Q filtrada e de seguida equilibrada com cerca de 100 mL de solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl, utilizando um fluxo de 0,5 mL/min. Posteriormente, a solução de proteína foi carregada na coluna utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e eluída, monitorizando a absorvância a um comprimento de onda de 280 nm.

As frações recolhidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, de forma idêntica ao anteriormente mencionado.

Por último, juntaram-se as frações que continham ambas as subunidades AioA e AioB e a amostra de proteína foi novamente concentrada, determinando a sua concentração final através da Lei de Lambert-Beer, utilizando o Nanodrop SpectraMax190 (Molecular Devices) acoplado ao programa SoftMax® Pro Softwares. A alíquota final obtida foi armazenada a -80 °C.

3.4. Ensaio de cristalização e *soaking*

A cristalização da arsenito oxidase nativa e mutantes AioA Q726G e AioB F108A, foi conseguida utilizando uma condição de cristalização previamente determinada e otimizada no laboratório de Cristalografia de Proteínas contendo: 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0 – 8,0, 2% PEG 400 e 2 M sulfato de amónio [(NH₄)₂SO₄]. Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando uma mistura de duas soluções de cristalização com valores de pH a 7,0 e 8,0, em diferentes proporções, como descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Proporção de soluções precipitantes utilizadas para os ensaios de cristalização da arsenito oxidase de NT-26.

| Solução de cristalização | Proporção de solução utilizada no ensaio (%) | | | | | |
|--|--|----|----|----|----|-----|
| | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 8,0; 2% PEG 400 e 2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |

Os ensaios de cristalização foram realizados através do método de difusão de vapor e da técnica de gota assente em placas de 24 reservatórios (XLR, Molecular Dimensions), utilizando uma proporção de gota de 2 µL de proteína, a uma concentração de 12,15 mg/mL, e 1 µL de solução precipitante, e um volume de 500 µL de solução precipitante no reservatório. Os ensaios foram realizados às temperaturas de 4 °C e 20 °C e a visualização das gotas foi efetuada com recurso a um microscópio óptico (modelo SZH10, Olympus).

Na tentativa de descobrir novas condições de cristalização favoráveis foi também realizado um *screening*, isto é, uma variação de várias condições experimentais. Para tal, testaram-se os *screens* 80! (baseado no *screen* de Jancarik *et al.*, 1991) e Salt-Rx (consultar Anexo 5, Tabela 7.3) utilizando o *robot* de cristalização Oryx8 (Douglas Instruments).

Aquando da realização dos ensaios de cristalização, a uma temperatura de 20 °C, foram adicionados 50 µL de solução precipitante a cada um dos 96 reservatórios da placa de cristalização, e foi escolhida uma proporção de proteína:solução precipitante de 3:1, utilizando uma alíquota de proteína, previamente purificada, a uma concentração final de 15 mg/mL. A visualização das gotas foi efetuada com recurso a um microscópio óptico (modelo SZH10, Olympus).

No decurso de uma avaria na câmara de cristalização de 4°C, que provocou uma subida de temperatura gradual até cerca de 30 °C, verificou-se o aparecimento de cristais em gotas que tinham sido realizadas duas semanas antes. Deste modo, de forma a perceber se a variação de temperatura influenciava a formação de cristais de arsenito oxidase, foram realizados novos ensaios de cristalização, utilizando a misturas de soluções precipitantes apresentada na Tabela 3.2, mas realizando vários ciclos de variação de temperatura, que se encontram sumariados na Tabela 3.3, apresentada de seguida.

Tabela 3.3. Ensaios de variação de temperatura testados na realização de ensaios de cristalização da arsenito oxidase.

| Ensaio | Temperatura (°C) | Tempo de permanência das gotas |
|--------|----------------------------|---|
| 1 | 4 (realização das gotas) | 1 semana |
| | 20 | 6 horas |
| | 30 | 12 horas |
| | 20 | 6 horas |
| | 4 | Até se verificar aparecimento de cristais |
| 2 | 30 (incubação da proteína) | 30 minutos |
| | 20 (realização das gotas) | 1 hora |
| | 4 | Até se verificar aparecimento de cristais |
| 3 | 30 (incubação da proteína) | 5 minutos |
| | 4 | Até se verificar aparecimento de cristais |
| 4 | 20 (realização das gotas) | <i>Overnight</i> |
| | 30 | 24 horas |
| | 20 | 6 horas |
| | 4 | Até se verificar aparecimento de cristais |
| 5 | 4 (realização das gotas) | 1 hora |
| | 10 | 2 horas |
| | 16 | 2 horas |
| | 22 | 2 horas |
| | 30 | 2 horas |
| | 22 | 2 horas |
| | 16 | 2 horas |
| | 10 | 2 horas |
| | 4 | Até se verificar aparecimento de cristais |

Para os melhores cristais obtidos de Aio nativa, foram realizados *soakings*. Os cristais foram inicialmente incubados com 4 µL de uma solução de 50 mM de ferricianeto de potássio [K₃(Fe(CN)₆], 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5; 2% PEG 400 e 2.2 M sulfato de amónio, durante um período de 30 minutos.

De seguida, foi adicionado, aos mesmos cristais, 8 µL de uma solução de 10 mM de tartarato de antimónio e potássio tri-hidratado ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$), 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5; 2% PEG 400 e 2,2 M $(NH_4)_2SO_4$, realizando diferentes tempos de incubação em diferentes cristais, nomeadamente de 1 hora ou 2 horas e 30 minutos.

Terminado o período de incubação, os cristais foram estabilizados numa solução de *harvesting buffer* de 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5; 2% PEG 400 e 2,2 M sulfato de amónio, cuja concentração de agente precipitante é superior comparativamente à utilizada na condição de cristalização, e de seguida, transferidos para uma solução crio-protetora de 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5; 2% PEG 400, 2,2 M sulfato de amónio e 20 % glicerol.

Os melhores cristais obtidos para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A foram também estabilizados na solução de *harvesting buffer* e transferidos para uma solução crio-protetora com 20% de glicerol.

3.5. Recolha de dados de difração de raios-X e resolução da estrutura tridimensional

Os cristais foram arrefecidos a temperaturas criogénicas, através da utilização de azoto líquido, e analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas PXIII do *Swiss Light Source* (SLS) em Villigen, Suíça (em Novembro de 2015 e Abril de 2016) e ID23-1 do *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) em Grenoble, França (em Março de 2016).

Após recolha de dados de difração de raios-X, procedeu-se ao tratamento dos mesmos através de diferentes programas informáticos, com intuito de obter a estrutura tridimensional das proteínas. Para tal, foi inicialmente utilizado o programa XDS para realizar o processamento dos dados recolhidos, através do qual é feita a indexação das reflexões medidas e respetivas intensidades (I_{hkl}), e mediante um processo de penalizações é possível escolher qual a célula unitária que melhor se adequa às reflexões recolhidas (Kabsch, 2010).

De seguida, procedeu-se ao tratamento dos dados previamente indexados através do conjunto de programas CCP4 (do inglês *Collaborative Computational Project, Number 4*) (Dodson *et al.*, 1997). Os dados foram primeiramente processados com recurso ao programa Aimless que permite identificar o grupo espacial a que pertence o cristal (tendo em conta as ausências sistemáticas), faz um escalonamento dos dados e indica várias estatísticas ilustrativas da qualidade dos dados de difração (Evans, 2006).

A resolução do Problema da Fase através do método de Substituição Molecular conseguiu-se com recurso ao programa Refmac5 (Murshudov *et al.*, 2011). Realizou-se um refinamento de corpo rígido (*rigid body refinement*) utilizando como modelo homólogo uma estrutura tridimensional da Aio do mesmo organismo, previamente obtida no Laboratório de Cristalografia de Proteínas, já que não se verificou uma alteração no grupo espacial ou constantes da célula unitária dos vários cristais medidos.

As estruturas obtidas foram refinadas utilizando o programa Refmac5, visualizando e ajustando a densidade eletrônica, após cada ciclo de refinamento, através do programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Os mapas de densidade eletrônica e densidade anômala foram gerados a partir dos programas CAD e FFT, e as imagens obtidas foram geradas no programa de visualização molecular Pymol (DeLano, 2002; Read & Schierbeek 1988).

3.6. Ensaios cinéticos por Espectroscopia de UV/Visível

Os ensaios cinéticos foram realizados para a Aio nativa e mutantes AioA Q726G e AioB F108A, visando como principal objetivo a determinação da atividade específica de forma a inferir o efeito das mutações realizadas na atividade da proteína e no respetivo mecanismo de transferência eletrônica.

O procedimento experimental descrito foi baseado em informação descrita anteriormente na literatura e em informação fornecida pela Professora Joanne Santini (Institute of Structural and Molecular Biology, University College of London) (Warellow *et al.*, 2013).

Os ensaios cinéticos de espectroscopia de UV/Visível foram conduzidos a uma temperatura de 25 °C, monitorizados no espectrofotómetro Ultrospec 2100 (Amersham Biosciences) e foram utilizadas células de quartzo de 1 mL (Hellma). Os ensaios foram realizados através da monitorização da redução de DCPIP (2,6- Diclorofenolindofenol) a um comprimento de onda de 600 nm. Como substrato da reação foi utilizada uma solução de arsenito de sódio (Na_3AsO_3) a pH 8,0.

Aquando da realização dos ensaios cinéticos utilizou-se 20 µg/mL de proteína numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl; 300 µM DCPIP numa solução tampão de 50 mM MES pH 5,5 e 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0.

Foram inicialmente pipetados para a célula de quartzo 900 µL de solução tampão 50 mM MES pH 5,5; 80 µL DCPIP 3,75 mM, dissolvido em tampão MES pH 5,5, e 10 µL de proteína a uma concentração de 2 mg/mL, monitorizando continuamente a absorvância a 600 nm. Verificada a estabilização da absorvância, após adição de proteína e DCPIP, foram pipetados 10 µL de arsenito de sódio 250 mM, monitorizando depois o decréscimo da absorvância a 600 nm decorrente da oxidação do substrato e consequente redução de DCPIP.

Para cada proteína de estudo, nomeadamente AioAB nativa, AioA Q726G e AioB F108A, os ensaios foram realizados na forma de replicados técnicos.

3.7. Mutagénese dirigida da subunidade AioA

A realização de mutagénese dirigida em resíduos específicos da subunidade AioA da arsenito oxidase de *Rhizobium* NT-26 teve como objetivo a obtenção de diversos mutantes de forma a inferir o efeito das mutações em resíduos alvo, localizados perto do cofator de molibdénio (Moco) e do centro de [3Fe-4S] desta subunidade.

No presente estudo foram elaborados vários mutantes, nomeadamente D169A/N e E453A/Q. Este procedimento foi realizado inicialmente no laboratório da Professora Joanne Santini, sob a sua orientação, e posteriormente no laboratório de Cristalografia de Proteínas, sob orientação da Professora Teresa Santos-Silva.

O plasmídeo recombinante obtido através da clonagem dos genes *aioA* e *aioB* (*aioBA*), no vetor de expressão pPROEX-HTb (Invitrogen), foi utilizado como molde para mutar os resíduos de interesse: Asp169 e Glu453, pelo método de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) utilizando o *kit* de mutagénesis dirigida QuikChange® II XL (Aligent).

Para tal, inicialmente foram desenhadas duas sequências complementares de oligonucleótidos que continham as mutações desejadas, para cada um dos mutantes em estudo, encontrando-se as sequências apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Sequências de oligonucleótidos utilizadas para a reação de amplificação dos vários mutantes em estudo. Os códons que codificam aminoácidos para as diferentes mutações encontram-se destacados em cada uma das sequências de oligonucleótidos.

| Mutante em estudo | Sequência de oligonucleótidos (5'-3') |
|-------------------|--|
| AioA D169A | CGTATCGGCCTTT G CCCATGGCGGTGC (<i>Forward</i>) GCACCGCCATGG G CAAAGGCCGATACG (<i>Reverse</i>) |
| AioA E453A | GGCGGACACCAG G CAGGCTATGTGCG (<i>Forward</i>) CGCACATAGCCT G CCTGGTGTCCGCC (<i>Reverse</i>) |
| AioA D169N | CGTATCGGCCTTT A ACCATGGCGGTGCAGG (<i>Forward</i>) CCTGCACCGCCATGG T TAAAGGCCGATACG (<i>Reverse</i>) |
| AioA E453Q | GGCGGACACCAG C AAGGCTATGTGCGCC (<i>Forward</i>) GGCGCACATAGCCT T GCTGGTGTCCGCC (<i>Reverse</i>) |

3.7.1. Reação de amplificação com recurso ao *kit* QuikChange® II XL

A reação de amplificação, para cada um dos mutantes, foi realizada para um volume final de 25 µL, tendo sido pipetados 19 µL de água Milli-Q, previamente autoclavada, 2,5 µL de *Reaction Buffer* 10x (fornecido no *kit*), 1,5 µL de reagente *QuikSolution* (fornecido no *kit*), 0,5 µL de dNTP *mix* (fornecido no *kit*), 10 ng de DNA molde de cadeia dupla, 125 ng de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) e por último adicionou-se 0,5 µL de DNA polimerase PfuUltra HF (2,5 U/µL). De seguida, o programa de amplificação foi realizado num termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf), encontrando-se os parâmetros utilizados apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros utilizados na reação de amplificação para o *kit* QuikChange® II XL.

| Segmento | Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|----------|------------------|------------------|-------------------------|
| 1 | 1 | 95 | 1 minuto |
| | | 95 | 50 segundos |
| 2 | 19 | 60 | 50 segundos |
| | | 68 | 5 minutos e 30 segundos |
| 3 | 1 | 68 | 7 minutos |

Terminada a reação de amplificação, adicionou-se a cada produto de reação 1 µL da enzima DpnI (fornecida no *kit*), desencadeando, assim, a digestão da cadeia de DNA utilizada como molde. De seguida, as misturas de reação foram brevemente centrifugadas (*short spin*) numa microcentrifuga (MiniSpin® Plus, Eppendorf) e incubadas a 37 °C (BD-56, Binder) durante 2 horas.

3.7.2. Transformação de células competentes XL10-Gold

A transformação de células competentes XL10-Gold, fornecidas no *kit* QuikChange® II XL (Aligent) foi realizada em ambiente estéril. Inicialmente, para cada um dos mutantes em estudo, foram pipetados 45 µL de células competentes XL10-Gold para um *falcon* estéril, de seguida adicionou-se 2 µL de β-Mercaptoetanol (fornecido no *kit*) e incubou-se durante 10 minutos em gelo.

Posteriormente, adicionou-se 2 µL do produto da reação de amplificação e incubou-se novamente em gelo durante 30 minutos, seguindo-se a incubação da mistura de reação a 42 °C durante 30 segundos. De seguida, adicionou-se 500 µL de meio de cultura LB e incubou-se durante 1 hora a 37 °C com agitação a 180 rpm (Innova 4230, New Brunswick Scientific).

O produto obtido aquando da transformação foi plaqueado em placas de LB-agar com 100 µg/mL de ampicilina (AMP). As placas foram posteriormente incubadas a uma temperatura de 37 °C durante a noite.

3.7.3. Otimização de condições no procedimento de mutagénesis dirigida

Tendo-se verificado em diversas tentativas a ausência do aparecimento de colónias transformantes para os mutantes D169A/N e E453A/Q, foram encomendadas novas sequências de oligonucleótidos, apresentadas de seguida na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Novas sequências de oligonucleótidos utilizadas para a realização de mutagénesis dirigida e obtenção dos mutantes D169A, E543A, D169N e E453Q. Os codões que codificam aminoácidos para as diferentes mutações encontram-se destacados em cada uma das sequências de oligonucleótidos.

| Mutante em estudo | Sequência de oligonucleótidos (5'-3') |
|-------------------|--|
| AioA D169A | CATCGTATCGGCCTTT GCCC ATGGCGGTGCAGGCG (<i>Forward</i>) CGCCTGCACCGCCAT GGGC AAAGGCCGATACGATG (<i>Reverse</i>) |
| AioA E453A | GCCTTGGCGGACACCA GGC AGGCTATGTGCGC (<i>Forward</i>) GCGCACATAGCCT TGC TGGTGTCCGCCAAGGC (<i>Reverse</i>) |
| AioA D169N | CATCGTATCGGCCTTT AACC ATGGCGGTGCAGGCG (<i>Forward</i>) CGCCTGCACCGCCAT GTTA AGGCCGATACGATG (<i>Reverse</i>) |
| AioA E453Q | GCCTTGGCGGACACCA CA AGGCTATGTGCGC (<i>Forward</i>) GCGCACATAGCCT TG CTGGTGTCCGCCAAGGC (<i>Reverse</i>) |

Utilizando as novas sequências de oligonucleótidos realizou-se novamente a reação de amplificação e transformação de células competentes, de acordo com o procedimento referido anteriormente. No entanto, terminado este procedimento não se verificou o aparecimento de colónias transformantes para nenhum dos mutantes em estudo.

Posto isto, na tentativa de obter os mutantes D169A/N e E453A/Q, recorreu-se à utilização do *kit* de mutagênese dirigida NZYMutagenesis Kit (NZYTech), utilizando novamente as sequências de oligonucleótidos apresentadas na Tabela 3.6. Este procedimento foi realizado no laboratório de Cristalografia de Proteínas do UCIBIO-REQUIMTE (FCT, UNL).

3.7.4. Reação de amplificação com recurso ao *kit* NZYMutagenesis

A reação de amplificação, para cada um dos mutantes, foi preparada para um volume final de 50 μ L, tendo sido pipetados 40 μ L de água Milli-Q, previamente autoclavada, 5 μ L de *Reaction Buffer* 10x (fornecido no *kit*), 1 μ L de dNTP mix (fornecido no *kit*), 60 ng de DNA molde de cadeia dupla, 125 ng de cada um dos primers (*forward* e *reverse*) e por último adicionou-se 1 μ L de DNA polimerase *NZYProof* (2,5 U/ μ L).

O programa de amplificação foi realizado num termociclador (My Cycler, Biorad), utilizando os parâmetros apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Parâmetros utilizados na reação de amplificação com o *kit* NZYMutagenesis.

| Segmento | Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|----------|------------------|------------------|------------|
| 1 | 1 | 95 | 2 minutos |
| 2 | 18 | 95 | 1 minuto |
| | | 60 | 1 minuto |
| | | 68 | 11 minutos |
| 3 | 1 | 68 | 15 minutos |

A eficiência de amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando NZYLadder III (NZYTech) como marcador de pesos moleculares. A cada 10 μ L de produto de reação de amplificação foram adicionados 2 μ L de *loading buffer* Orange G (NZYTech). Aplicou-se uma corrente constante de 100 V durante cerca de 60 minutos e os resultados foram visualizados no aparelho GelDoc (Biorad).

De igual modo ao realizado para o *kit* QuikChange® II XL, terminada a reação de amplificação, adicionou-se a cada produto de reação 5 μ L da enzima DpnI. De seguida, as misturas de reação foram brevemente centrifugadas (MiniSpin® Plus, Eppendorf) e incubadas a 37 °C (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-Bio) durante 2 horas.

3.7.5. Transformação de células competentes DH5 α

A transformação de células competentes da estirpe DH5 α de *E. coli* foi realizada em ambiente estéril. Inicialmente, para cada um dos mutantes, foram pipetados 100 μ L de células competentes DH5 α para um *eppendorf* estéril, de seguida adicionou-se 20 μ L do produto da reação de amplificação tratado com *DpnI* e incubou-se em gelo durante 30 minutos, seguindo-se a incubação da mistura de reação a 42 °C durante 40 segundos.

De seguida, adicionou-se 900 µL de meio de cultura LB e incubou-se durante 1 hora a 37 °C com agitação a 180 rpm (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-Bio). Terminado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 1 minuto, removendo posteriormente 950 µL de sobrenadante.

As células foram gentilmente ressuspendidas no volume restante e o produto obtido aquando da transformação foi plaqueado em placas de LB-agar com 100 µg/mL de ampicilina (AMP). As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante a noite.

Tendo-se verificado, no dia seguinte, o aparecimento de colónias transformantes para os vários mutantes em estudo, procedeu-se ao isolamento de DNA plasmídico, a partir de uma única colónia, com recurso ao *kit* NZYMiniprep (NZY Tech). A quantificação dos plasmídeos recombinantes foi efetuada através do Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000c) e a sequenciação foi realizada pela empresa STABVida. Os resultados provenientes da sequenciação foram analisados com recurso ao programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011).

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudos com AioAB nativa

4.1.1. Clonagem e expressão heteróloga em *Escherichia coli*

O presente estudo teve como principal objetivo a obtenção de uma estrutura de elevada resolução da Aio nativa de *Rhizobium* NT-26, de modo a clarificar o mecanismo de reação da enzima. Para tal, foi necessária a realização de várias etapas conducentes à obtenção de uma estrutura por cristalografia de raios-X, nomeadamente a expressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificação da proteína, e realização de ensaios de cristalização para obtenção de cristais de boa qualidade.

Como referido no subcapítulo 3.1, o procedimento de clonagem foi realizado pela Professora Joanne Santini, no qual os genes *aioB* e *aioA* (*aioBA*) de *Rhizobium* NT-26 foram primeiramente amplificados sem a sequência *Tat leader* nativa, que codifica os primeiros 40 resíduos da subunidade AioB (MSRCQNMVDIGRRQFLRGGALAAAGATAAVFGVGAPQARA).

Como referido anteriormente, a arsenito oxidase é transportada do citoplasma para o periplasma, através da via TAT, pelo reconhecimento da sequência sinal (*Tat leader*) presente na região N-terminal da subunidade AioB (consultar subcapítulo 1.3.1.2).

Assim sendo, os genes *aioBA* foram amplificados sem esta mesma sequência e clonados no vetor de expressão pPROEX-HTb (Invitrogen), que atua sob controlo do promotor *trc*, indutível por IPTG, permitindo a expressão dos genes *aioBA* no citoplasma de *E.coli*.

O vetor pPROEX-HTb (consultar Anexo 3, Figura 7.4) foi construído com o gene *lacI^f* que contém uma mutação num único nucleótido do hexâmero -35, conduzindo ao aumento significativo do produto deste gene, uma proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *trc*, permitindo a prevenção da expressão até que se adicione IPTG, o que permite, por sua vez, o controlo regulado da expressão do constructo (Robinson, 2011; Rosano *et al.*, 2014; Saluta *et al.*, 1998; Tegel *et al.*, 2011).

A Figura 4.1, apresentada de seguida, ilustra de forma esquemática a regulação da expressão dos genes *aioBA* clonados no vetor pPROEX-HTb.

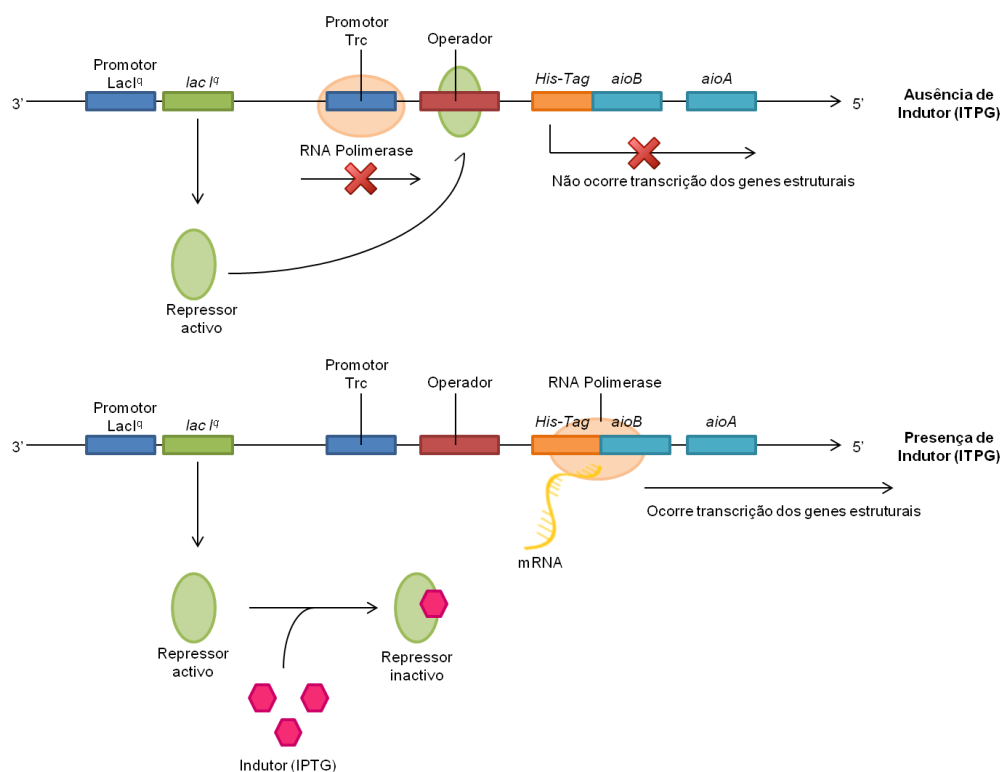


Figura 4.1. Regulação da expressão dos genes *aioBA* sobre controlo do promotor *Trc*, indutível por IPTG. Na ausência de IPTG (composto análogo à alolactose), o gene operador é bloqueado pela proteína repressora (*LacI^q*), impedindo a progressão da RNA polimerase, e consequentemente a transcrição dos genes estruturais *aioB* e *aioA*. Na presença de IPTG, este atua como indutor ao ligar-se à proteína repressora, prevenindo a ligação da mesma à região operadora. Deste modo, a RNA polimerase consegue ligar-se à região operadora e prosseguir com a transcrição dos genes *aioB* e *aioA*.

Aquando da transformação foram utilizadas células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , para posterior expressão heteróloga em condições aeróbias. Torna-se importante salientar que o protocolo utilizado para a expressão heteróloga, desenvolvido por Thomas Warellow e coautores, resultou de múltiplas etapas de otimização em que foram testadas várias estirpes, nomeadamente BL21, C43 e DH5 α , e diferentes condições de crescimento (Warellow *et al.*, 2013).

Tendo em conta que o maior rendimento celular em condições aeróbias foi obtido aquando da utilização da estirpe celular DH5 α , procedeu-se à escolha da mesma como hospedeira de expressão. Posto isto, e salientando que DH5 α é normalmente utilizada em procedimentos de clonagem, a expressão heteróloga em *E. coli* foi conseguida através da realização de um protocolo (consultar subcapítulo 3.2) com múltiplas etapas que visaram a aclimação das células aos vários aditivos adicionados (ampicilina, molibdato de sódio e IPTG), bem como o crescimento celular lento, com o principal objetivo de impedir a formação de corpos de inclusão, isto é, a presença de proteína na fração insolúvel do extrato celular. A expressão foi induzida através da adição de 40 μ M de IPTG, tendo em conta, como referido, que o operon em estudo se encontra sob a regulação do operon *LacI^q*.

Após lise celular, centrifugação do extrato obtido e recolha da fração solúvel procedeu-se à purificação.

4.1.2. Purificação de AioAB nativa

Na primeira etapa de purificação foi realizada uma cromatografia de afinidade por iões metálicos imobilizados (IMAC) tendo sido utilizada uma coluna HisTrap™ acoplada ao sistema AKTA START.

A cromatografia de afinidade por iões imobilizados (IMAC) baseia-se no reconhecimento molecular, envolvendo interações específicas e reversíveis, de um ligando alvo, neste caso os resíduos da cauda de histidinas presentes na extremidade N-Terminal da subunidade AioB, por uma molécula que se encontra imobilizada na coluna, nomeadamente os iões de níquel na forma de ácido nitriloacético de níquel (Ni-NTA). Uma das vantagens de utilização de caudas de histidina (*His-Tag*) para purificação de proteínas reside na pequena dimensão dos ligandos utilizados. Dada a sua pequena dimensão, os ligandos têm um efeito mínimo no enrolamento (*folding*) da proteína, e se a cauda de histidina for colocada numa das extremidades da proteína, esta pode ser facilmente removida pela utilização de uma endoprotease.

Deste modo, este método permite a separação inicial de misturas de biomoléculas com base em interações biológicas específicas, tendo sido escolhido pela elevada especificidade, facilidade de utilização e elevado rendimento do processo.

A primeira etapa de purificação teve como objetivo a separação inicial da AioAB-His das restantes proteínas presentes no extrato celular, encontrando-se o cromatograma obtido na Figura 4.2.

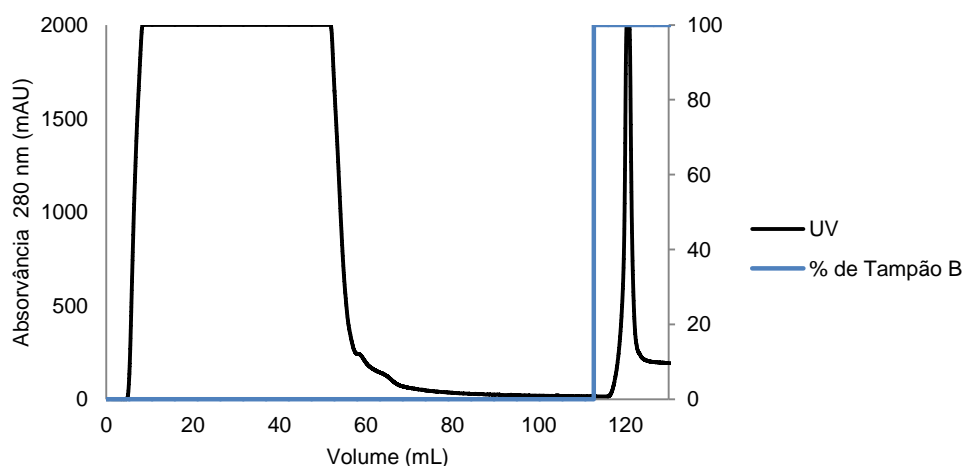


Figura 4.2. Cromatograma obtido na primeira etapa de purificação por IMAC. No cromatograma é observado um pico correspondente à proteína de interesse, eluída a cerca de 120 mL. A eluição da AioAB-His ocorreu quando do aumento da força iónica, tendo sido utilizada uma solução tampão de 20 mM fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 0,5 M imidazole (Tampão B).

Pela análise do cromatograma obtido é possível visualizar que na fase de inicial de lavagem com tampão de ligação (20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole) são eluídas proteínas presentes no extrato celular que não apresentam afinidade de ligação para os íons metálicos imobilizados na coluna HisTrap™. Deste modo, este passo permite a eliminação de substâncias que não possuem afinidade com o ligando, mantendo a molécula alvo ligada ao suporte de afinidade.

De seguida, de forma a libertar e eluir as moléculas de interesse recorreu-se a um passo de dessorção, conseguido de forma não específica através do aumento força iónica, utilizando 20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 0,5 M imidazole. O aumento da concentração de imidazole na solução tampão permitiu, assim, a eluição da AioAB-His, uma vez que aumentou a competição do mesmo com a proteína, pelo agente quelante metálico imobilizado na resina. As frações recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE, encontrando os resultados apresentados na Figura 4.3.

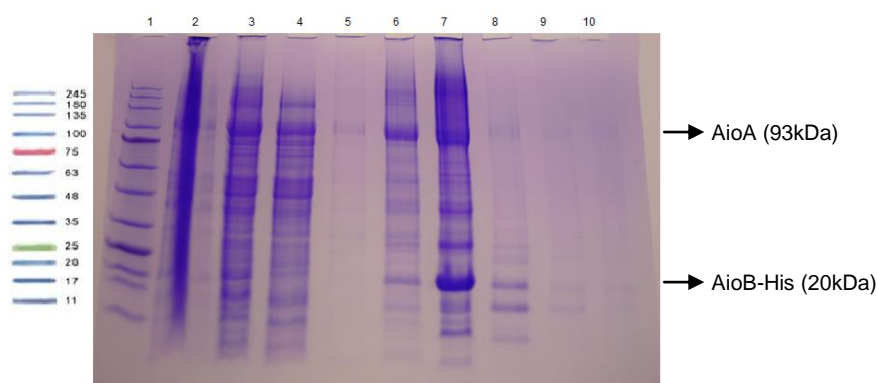


Figura 4.3. SDS-PAGE (12,5 %) com as frações provenientes da etapa de expressão e do primeiro passo de purificação da arsenito oxidase. 1- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II (NZY Tech); 2- Extrato total; 3- Extrato solúvel; 4- Fracção *Flow-through* (IMAC); 5 a 10- Fracções de 1,5 mL provenientes da purificação por IMAC, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das frações.

Pela análise do gel obtido (Figura 4.3) foi possível confirmar, nos poços 6, 7 e 8, a presença da AioAB, devido à existência de bandas a 93 kDa (subunidade A) e 20 kDa (subunidade B com cauda de histidinas na extremidade N-terminal). No entanto, para além das referidas bandas, é também possível visualizar a existência de várias outras bandas correspondentes a outras proteínas de peso molecular variável, indicando que a proteína de interesse não se encontra totalmente pura. Tendo em conta que a utilização de proteína com elevado grau de pureza é um fator determinante aquando da realização de ensaios de cristalização foram realizadas etapas adicionais de purificação.

Para a realização dos ensaios de cristalização desta proteína, é também necessário remover a cauda de histidina, tendo para isso sido adicionada endoprotease TEV às frações que continham AioAB-His, para diálise durante a noite numa solução de 20 mM tampão fosfato pH 7,3; 0,2 M NaCl; 20 mM imidazole, 1 mM EDTA e 1 mM DTT.

Após clivagem enzimática com TEV e diálise, foi realizada uma nova IMAC, utilizando novamente uma coluna HisTrap™ acoplada ao sistema AKTA START. Nesta segunda cromatografia, a fração correspondente à AioAB foi eluída na fase inicial de lavagem, uma vez que a proteína deixou de apresentar afinidade para os íons de níquel, devido à remoção da cauda de resíduos de histidina por ação da endoprotease TEV, como é possível verificar no cromatograma apresentado na Figura 4.4. Verificou-se também que a TEV, bem como outras proteínas contaminantes, permaneceram ligadas à resina da coluna, tendo sido eluídas por aumento da força iônica, através da utilização de 0,5 M de imidazole.

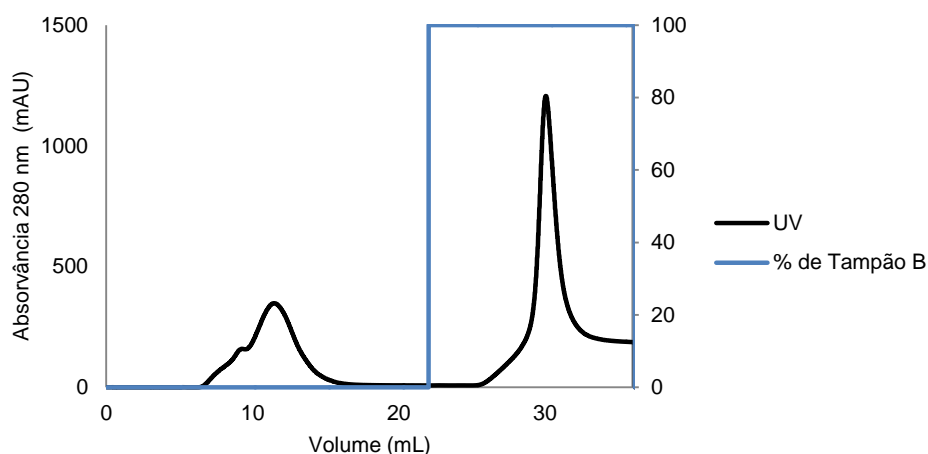


Figura 4.4. Cromatograma obtido na segunda etapa de purificação por IMAC. No cromatograma é observado um pico correspondente à proteína de interesse eluída na fase inicial de lavagem, entre 5 mL e 15 mL, utilizando uma solução tampão de 20 mM fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole. O pico de absorvância obtido a cerca de 30 mL, na fase final da purificação, corresponde à eluição da TEV e outras proteínas contaminantes presentes em solução, conseguida por aumento da força iônica (100 % de Tampão B com 0,5M de imidazole).

A fração de proteína proveniente da segunda etapa de purificação foi concentrada para um volume inferior a 4,5 mL e aplicada a três colunas His-Trap Desalting conectadas em série e acopladas ao sistema de purificação, com o principal objetivo de realizar a permuta da solução tampão de 20 mM fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole, em que a proteína se encontrava, para uma solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl, utilizada na etapa seguinte de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

Como referido anteriormente, a obtenção de proteína com elevado grau de pureza é fundamental para a realização de ensaios de cristalização. Posto isto, foi realizada uma terceira etapa de purificação através de cromatografia de exclusão molecular, dado que este método de purificação permite uma eficaz separação de proteínas com diferentes pesos moleculares, tendo sido realizada com o principal objetivo de isolar a fração de AioAB de outras proteínas ainda presentes em solução.

O protocolo de purificação foi descrito anteriormente no subcapítulo 3.3.3, e foi utilizada uma coluna Superdex 200™ 10/300 GL de 24 mL, acoplada ao cromatógrafo Shimadzu, encontrando-se o cromatograma obtido na Figura 4.5.

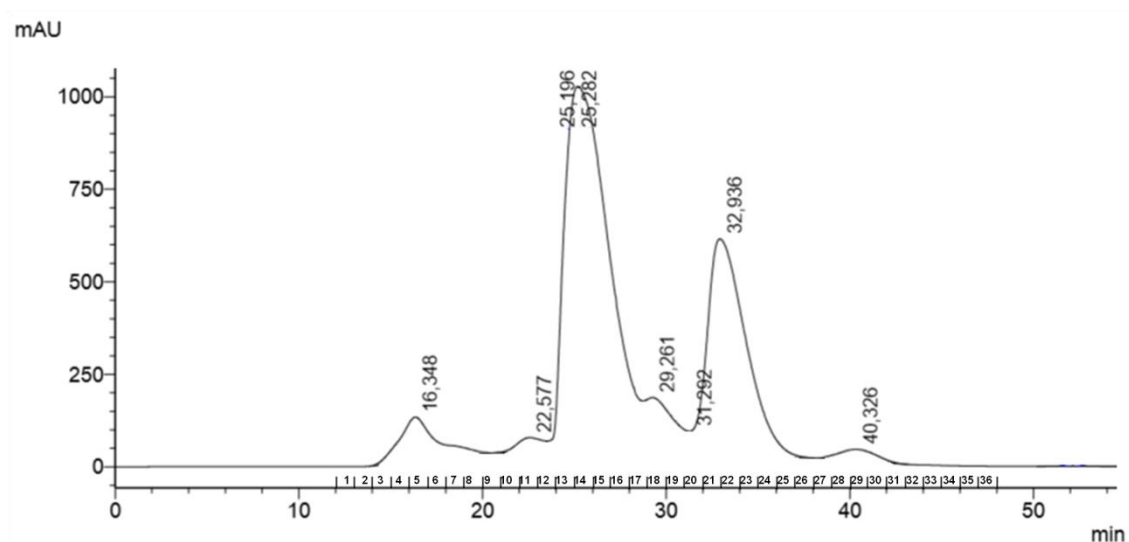


Figura 4.5. Cromatograma obtido na terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando um fluxo constante de 0,5 mL/minuto.

Pela análise do cromatograma obtido (Figura 4.5) é possível visualizar a existência de três picos, eluídos a aproximadamente 16, 25 e 32 minutos, correspondentes à eluição de proteínas de diferente peso molecular. As frações 5 e 12 a 24, assinaladas no cromatograma, foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 4.6).

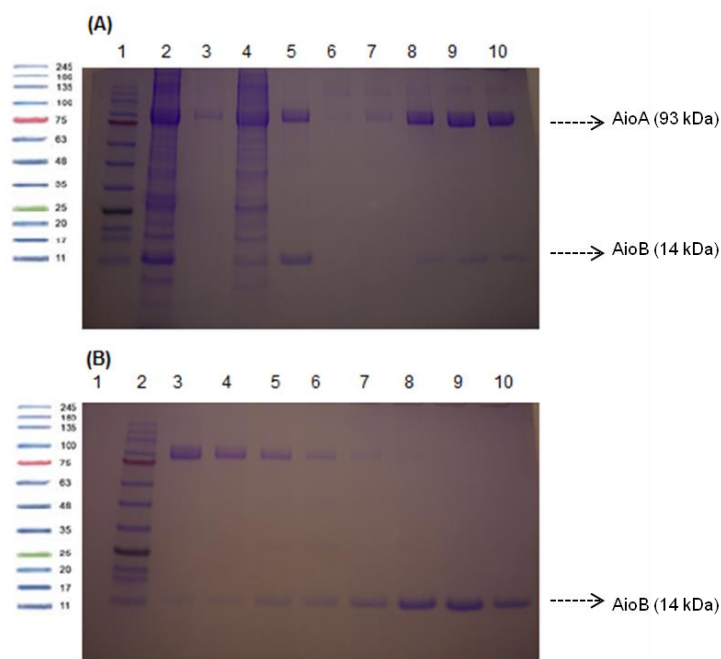


Figura 4.6. SDS-PAGE (12,5 %) com as frações provenientes de várias etapas da purificação. (A) 1- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II (NZY Tech); 2- Fração dialisada; 3 e 4- Frações de contaminantes da segunda cromatografia IMAC; 5- Fração dessalinizada; 6 a 10- Frações de 0,5 mL provenientes da purificação por cromatografia de exclusão molecular, respectivamente frações 12 a 16 assinaladas no cromatograma. (B) 1- Fração 5 assinalada no cromatograma (Figura 4.5). 2- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II (NZY Tech); 3 a 10- Frações 17 a 24 assinaladas no cromatograma.

Pela análise dos resultados obtidos por eletroforese, verifica-se que o pico do cromatograma observado entre 22 e 28 minutos, aproximadamente, corresponde à eluição de AioAB, onde se verifica a presença de duas bandas correspondentes às duas subunidades (AioA de 93 kDa e AioB de 14 kDa). No segundo pico de maior intensidade do cromatograma (eluição a cerca de 32 minutos) verifica-se a presença da subunidade AioB, o que poderá indicar uma maior expressão desta subunidade, comparativamente à subunidade AioA, quando se realizou a expressão heteróloga dos dois genes (*aioBA*). O pico de menor intensidade observado no cromatograma é indicativo da presença de proteínas contaminantes que, devido ao reduzido valor de absorvância, não são visualizadas no gel de SDS-PAGE.

Assim sendo, juntaram-se as frações 15 a 20 (Figura 4.5 e Figura 4.6) uma vez que estas continham ambas as subunidades, e as mesmas foram concentradas até se atingir um volume final de aproximadamente 50 μ L e uma concentração final de proteína de 15,89 mg/mL, calculada com recurso ao aparelho Nanodrop SpectraMax190, considerando um coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280\text{nm}}$) teórico de $136890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Warellow *et al.*, 2013).

Em suma, o protocolo utilizado para a expressão heteróloga em *E. coli* e purificação da arsenito oxidase de NT-26 permitiu a obtenção de proteína com elevado grau de pureza, possibilitando, deste modo, a progressão do trabalho experimental para a etapa seguinte na determinação da estrutura tridimensional, a realização de ensaios de cristalização.

4.1.3. Cristalografia de raios-X

4.1.3.1. Ensaios de cristalização e experiência de difração de raios-X

Os ensaios de cristalização foram realizados a temperaturas de 20 °C e 4 °C, recorrendo ao método de difusão de vapor e técnica de gota assente. Foram utilizadas placas de 24 reservatórios, utilizando uma proporção de gota de 2+1, com 2 μ L de proteína, a uma concentração de 12,15 mg/mL, e 1 μ L de solução precipitante, e um volume de 500 μ L de solução precipitante no reservatório.

A visualização das gotas, cerca de duas semanas após a sua realização, revelou, em algumas das condições, o aparecimento de pequenos cristais de coloração castanha, correspondentes a cristais da Aio.

Verificou-se o aparecimento de cristais para as condições em que se utilizou 100% da solução de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e uma mistura de 80% da solução referida com 20% da solução de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 8,0; 2% PEG 400 e 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4.7).

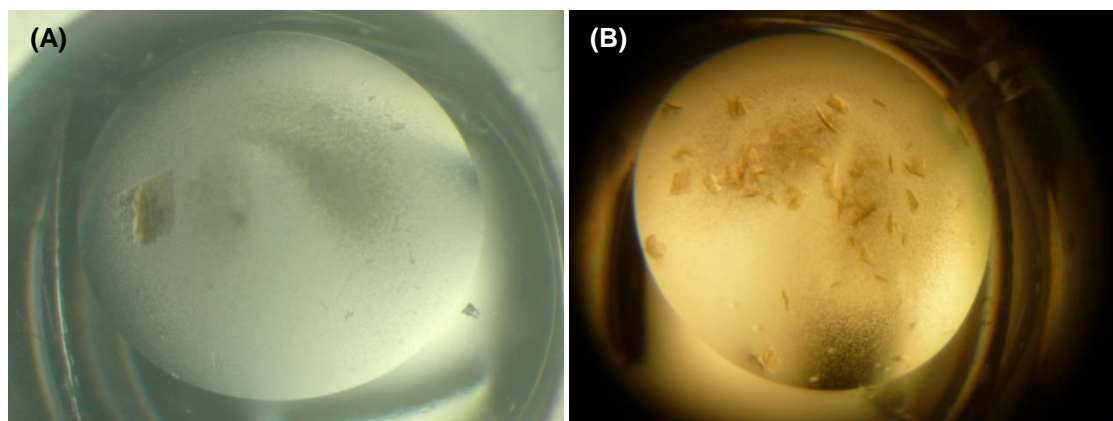


Figura 4.7. (A) Cristais de AioAB obtidos a 20 °C, com tamanho aproximado de 0,2 x 0,2 x 0,1 mm . Cristais obtidos para ensaios de gota assente e solução precipitante de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M (NH₄)₂SO₄ . (B) Cristais de AioAB obtidos a 4 °C, com tamanho aproximado de 0,2 x 0,2 x 0,1 mm. Cristais obtidos para ensaios de gota assente e solução precipitante de 80% da solução de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M (NH₄)₂SO₄ e 20 % da solução de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 8,0; 2% PEG 400 e 2 M (NH₄)₂SO₄.

Para os melhores cristais obtidos de Aio nativa, foram realizados *soakings*, com o intuito de formar aductos entre a proteína e compostos análogos ao arsenito, o substrato fisiológico da Aio. Tendo em conta a elevada especificidade de arsenito para a AioAB e a elevada velocidade de conversão de arsenito em arsenato, tornar-se-ia difícil visualizar alterações estruturais no centro ativo utilizando o substrato fisiológico da enzima. Neste sentido, recorreu-se a um composto análogo ao substrato, cuja catálise é mais lenta, possibilitando, eventualmente, a visualização de estados intermédios da reação no centro ativo da enzima, e a clarificação do mecanismo de ação da mesma de um ponto de vista estrutural.

Assim sendo, foram realizados *soakings* incubando primeiramente os cristais com 50 mM de ferricianeto de potássio [K₃(Fe(CN)₆] durante 30 minutos. A adição de ferricianeto de potássio, um agente oxidante, teve como objetivo ativar a enzima, garantindo que esta se encontra no estado oxidado e realiza reações redox sucessivas.

De seguida, foram adicionados 8 µL de uma solução de 10 mM de tartarato de antimónio e potássio tri-hidratado (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂ • 3H₂O), 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5; 2% PEG 400 e 2,2 M sulfato de amónio, testando diferentes tempos de incubação (1 hora ou 2 horas e 30 minutos). O composto C₈H₄K₂O₁₂Sb₂ • 3H₂O em solução é uma fonte de antimónio [Sb(III)], que é um análogo do substrato [As(III)], podendo também ser oxidado pela arsenito oxidase. Estudos realizados anteriormente demonstraram a capacidade de oxidação de Sb(III) por parte desta enzima, embora a uma velocidade bastante mais lenta ($V_{\max} = 18,4 \pm 1,2 \text{ nmol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) comparativamente ao arsenito ($V_{\max} = 120,4 \pm 6,0 \text{ } \mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), o substrato fisiológico (Wang *et al.*, 2015).

Terminado o período de incubação, os cristais foram estabilizados numa solução estabilizante, *harvesting buffer*, que possui a mesma composição da solução precipitante utilizada no ensaio de cristalização mas com uma maior concentração de agente precipitante, tendo como objetivo evitar que o cristal se dissolva durante a manipulação.

Os cristais foram de seguida transferidos para uma solução crio-protetora (conseguida pela adição de 20% de glicerol à solução estabilizante), de modo a prevenir a formação de gelo no interior da rede cristalina, que interfere na interpretação dos resultados de difração.

Por último, os cristais foram congelados em azoto líquido, de forma a minimizar a sua degradação aquando da experiência de difração, e analisados por radiação de sincrotrão na linha PXIII do SLS (Villigen, Suíça). Verificou-se que os cristais analisados de AioAB difrataram até uma resolução máxima de 1,89 Å (Figura 4.8).

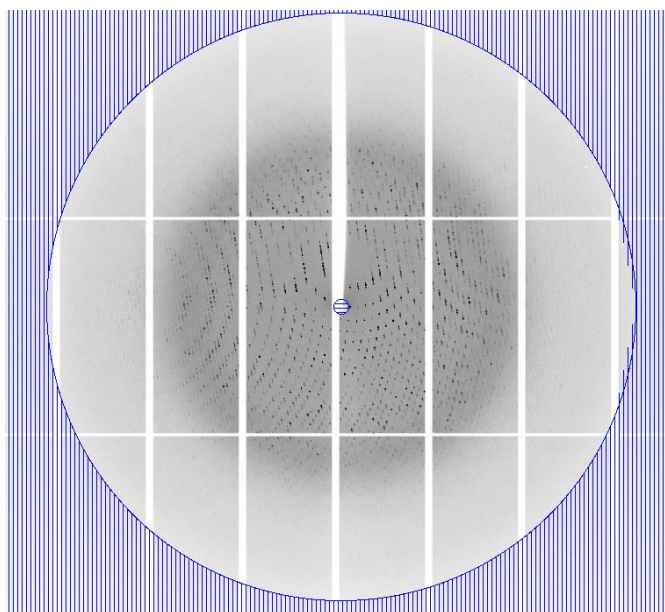


Figura 4.8. Padrão de difração obtido para o cristal de AioAB incubado com $[K_3(Fe(CN)_6)]$ e $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$. A experiência de difração foi efetuada na linha PXIII do SLS (Villigen, Suíça), e o conjunto de dados recolhido apresenta uma resolução máxima de 1,89 Å. Os dados foram recolhidos a um comprimento de onda fixo de 0,978 Å.

De seguida, torna-se necessário tratar as reflexões existentes no padrão de difração de modo a determinar os índices de Miller (hkl), as intensidades (I_{hkl}) e o respetivo erro associado (σ_{hkl}), tendo para tal recorrido ao programa XDS (Kabsch, 2010).

Os dados obtidos permitem verificar que o cristal em estudo possui os seguintes parâmetros para a célula unitária: $a = 141,5$ Å, $b = 148,3$ Å, $c = 232,6$ Å e $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$. Atendendo a que $a \neq b \neq c$ e $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, pode desde logo afirmar-se que o cristal apresenta um grupo cristalino ortorrômbico (consultar Anexo 1, Figura 7.2).

Para concluir acerca do grupo espacial do cristal, recorreu-se ao programa Aimless pertencente ao conjunto de programas CCP4 (Dodson, 1997; Evans, 2004). Este programa analisa a intensidade das reflexões obtidas, presentes no ficheiro hkl proveniente do XDS, e baseia-se na ausência sistemática dos valores de intensidade das reflexões para atribuir o grupo espacial, que reflete a simetria e organização das moléculas no cristal. Verificou-se então que o cristal de AioAB medido pertencia ao grupo espacial $P2_12_1$ (correspondente ao grupo espacial 18 nas Tabelas Internacionais de Cristalografia).

Este programa faz também o escalonamento dos dados, de forma a tornar comparáveis as intensidades das reflexões medidas, e fornece ainda uma análise estatística que permite avaliar a qualidade dos dados de difração, apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Estatísticas de qualidade dos dados de difração do cristal de AioAB com $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

$$R_{pim} = \frac{\sum_h (\frac{1}{N-1})^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad Multiplicidade = \frac{\text{número total de reflexões}}{\text{número total de reflexões únicas}}$$

$$V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

| Parâmetros | Resultados Globais |
|---|--|
| Resolução (Å) | 49,30-1,89 (1,98-1,89) |
| $\langle I/\sigma(I) \rangle$ | 13,1 (1,8) |
| $CC_{1/2}$ | 0,997 (0,511) |
| Número total de reflexões | 4881508 (230091) |
| Número de reflexões únicas | 354714 (17429) |
| R_{pim} (%) | 5,9 (16,5) |
| Mosaicidade (°) | 0,2 |
| Multiplicidade | 13,8 (13,2) |
| Completeness (%) | 100,0 (100,0) |
| Número de moléculas na unidade assimétrica | 2 |
| Coefficiente de Matthews (Å ³ / Dalton) | 2,79 |
| Conteúdo de solvente (%) | 55,93 |
| Grupo espacial | P22 ₁ 2 ₁ |
| Constantes da célula unitária (Å, °) | a= 141,5; b= 148,3; c= 232,6 $\alpha=\beta=\gamma=90$ |

A análise inicial das estatísticas obtidas permite verificar a qualidade dos dados e a confiança na utilização dos mesmos. Verifica-se que a intensidade média das reflexões é, aproximadamente, 13 vezes superior ao ruído associado ($\langle I/\sigma(I) \rangle$ de 13,1).

É também importante salientar que o mesmo se verifica na camada mais externa de resolução, onde o valor de $\langle I/\sigma(I) \rangle$ é de 1,8, indicando que a alta resolução os dados continuam a ter validade.

O coeficiente de correlação, designado por $CC_{1/2}$, é também um parâmetro indicativo da qualidade dos dados, usando, como o nome indica, apenas metade dos dados de cada reflexão única que são medidos, divididos de uma forma aleatória, sendo calculado entre as intensidades médias de cada subconjunto de dados. Deste modo, $CC_{1/2}$ fornece igualmente uma avaliação direta da relação sinal/ruído, sendo ainda um indicativo da existência ou não de erros sistemáticos nos dados medidos que possam derivar de uma incorreta distribuição das intensidades das reflexões (Diederichs & Karplus, 2013; Karplus & Diederichs, 2012).

Para a camada externa de resolução o seu valor deve ser superior a 0,5 e para o conjunto de dados recolhido apresenta um valor de 0,511.

Seguindo a análise das estatísticas, o parâmetro de R_{pim} expressa a precisão da média das intensidades, ao estabelecer que reflexões equivalentes (relacionadas por simetria) devem possuir intensidade semelhante, tendo em conta a multiplicidade. O seu valor deve situar-se entre 5 % e 10 %, como se verifica para o cristal em estudo, que apresenta um valor de 5,9 %.

Por sua vez, a mosaicidade traduz o grau de organização interna do cristal, tendo em conta o desfasamento das várias células unitárias presentes no espaço tridimensional do cristal. Deste modo, valores baixos são indicativos de cristais ordenados e, conseqüentemente, melhor difração. A mosaicidade média para o cristal medido foi de 0,2, salientando a elevada organização interna do monocristal.

A multiplicidade indica o número de vezes que uma dada reflexão foi medida, e pode ser calculada através do número de reflexões únicas (não relacionadas entre si por simetria) e do número de reflexões totais. Quanto maior a multiplicidade, mais precisa será a estimativa das intensidades das reflexões. A multiplicidade deste conjunto de dados tem um valor de 13,8.

A *completeness* demonstra a percentagem de reflexões medidas em relação ao número total de reflexões para cada grupo espacial, devendo aproximar-se o mais possível de 100 %. Neste caso, tanto os dados globais como os dados da camada externa de resolução apresentam um valor de 100 %, como desejável.

A determinação do conteúdo de solvente do cristal baseia-se no Coeficiente de Matthews, também designado por V_M , e permite determinar quantas moléculas existem na unidade assimétrica. Este parâmetro é definido pela razão entre volume e massa da célula unitária, estando diretamente relacionado com o volume de solvente existente no cristal. Apresenta, geralmente, um valor entre 1,5 e 6,0 Å³/Dalton, encontrando-se o valor obtido (2,79 Å³/Dalton) dentro do esperado (Rupp, 2010). O cristal apresenta um conteúdo de solvente de 55,93 % e a presença de duas moléculas na unidade assimétrica. Neste caso, cada molécula presente na unidade assimétrica corresponde a uma unidade funcional da proteína, um dímero de heterodímeros ($\alpha\beta$)₂ (ou seja, cada molécula corresponde a duas subunidades AioA e duas subunidades AioB).

Em suma, após análise das estatísticas apresentadas, torna-se possível afirmar que as mesmas são indicativas de boa qualidade dos dados de difração, possibilitando a passagem para a etapa seguinte, a resolução da estrutura tridimensional.

4.1.3.2. Resolução da estrutura e refinamento

O tratamento de dados realizados até ao momento, permitiu a determinação das intensidades das reflexões. Através do quadrado das intensidades medidas foi possível determinar o módulo dos fatores de estrutura, $|F_{\text{hkl}}|$. No entanto, não é possível determinar o ângulo da fase das ondas difratadas (α_{hkl}), dando origem ao chamado Problema da Fase.

Deste modo, foi necessário definir a melhor estratégia para resolver o Problema da Fase, e calcular o mapa de densidade eletrônica.

De entre os vários métodos utilizados para a resolução do Problema da Fase, foi escolhido o método de Substituição Molecular (MR, do inglês *Molecular Replacement*), dado que a estrutura desta proteína já é conhecida. Como modelo homólogo foi utilizada a estrutura de AioAB nativa de *Rhizobium* NT-26, determinada, em trabalho anterior, no laboratório de Cristalografia de Proteínas (dados não publicados). A estrutura escolhida como modelo, bastante semelhante à estrutura em estudo, apresenta uma resolução de 2,0 Å, tendo-se removido as moléculas de água e iões da estrutura, e utilizado apenas a cadeia polipeptídica, os centros metálicos (Rieske [2Fe-2S] e [3Fe-4S]) e os cofatores (*bis-MGD*) do átomo de molibdénio do centro ativo para o cálculo do mapa de densidade eletrônica.

A resolução do Problema da Fase através do método de Substituição Molecular conseguiu-se com recurso ao programa *Refmac5*, realizando um refinamento de corpo rígido (*rigid body refinement*). Torna-se importante salientar que a utilização desta abordagem só foi possível devido à existência de uma estrutura homóloga com elevado grau de semelhança, que cristalizou no mesmo grupo espacial obtido para o cristal em estudo (P22₁2₁). Comparativamente a outros programas utilizados para a resolução do Problema da Fase por Substituição Molecular, como o Phaser, o refinamento de corpo rígido permite, de uma forma mais simples, embora menos robusta, a obtenção da posição geral da proteína e a estimativa inicial das fases (McCoy, *et al.*, 2007; Murshudov *et al.*, 2011).

Aquando da realização de um refinamento de corpo rígido é feita a reestruturação de um conjunto padrão de parâmetros. Quando existe a expectativa de que o modelo de estudo seja semelhante a uma estrutura conhecida, mas cuja localização e orientação do cristal são desconhecidos, os parâmetros do modelo são reformulados. Os novos parâmetros consistem num conjunto de posições atómicas relativas a um sistema de coordenadas arbitrário e existem mais de seis parâmetros para especificar o mapeamento do sistema de coordenadas no cristal, sendo três desses parâmetros utilizados para descrever a translação da molécula e três para definir a rotação (Murshudov *et al.*, 2011; Tronrud, 2004).

Para cada grupo rígido, as operações de transformação são definidas e as novas posições atómicas são calculadas a partir de posições iniciais, com recurso à seguinte equação:

$$\mathbf{x}_{new} = \mathbf{R}_j(\alpha, \beta, \gamma)(\mathbf{x}_{old} - \mathbf{t}_{origin}) + \mathbf{t}_j$$

em que \mathbf{R}_j corresponde à matriz de rotação, responsável pela rotação da molécula na orientação correta, \mathbf{t}_{origin} corresponde ao centro de massa do grupo rígido e \mathbf{t}_j é a componente translacional da transformação, isto é, a operação de translação necessária para colocar a molécula, corretamente orientada, na célula unitária. \mathbf{x}_{old} são as coordenadas atómicas iniciais, e \mathbf{x}_{new} as posições atómicas depois da aplicação das operações de transformação (Murshudov *et al.*, 2011; Tronrud, 2004).

Em princípio, todos estes parâmetros podem ser refinados ao mesmo tempo, mas o refinamento é geralmente realizado separadamente para cada classe de parâmetros, que possuem propriedades diferentes. Os parâmetros de orientação e localização são refinados separadamente dos parâmetros de estrutura interna. Primeiramente, os parâmetros de orientação e localização são refinados a baixa resolução (tipicamente a 4 Å), enquanto que os parâmetros atômicos estão fixos. De seguida, os parâmetros atômicos são refinados considerando a totalidade dos dados, mantendo fixos os parâmetros externos.

Nos casos em que o refinamento de corpo rígido é utilizado, a estrutura interna da molécula é bem conhecida, enquanto que a localização e orientação são desconhecidas. Uma vez que a estrutura interna da molécula é conhecida com um grau de certeza razoável, torna-se possível criar um modelo parametrizado como o modelo de corpo rígido descrito acima (Murshudov *et al.*, 2011, Tronrud, 2004).

A principal desvantagem aquando da utilização de parametrização de corpo rígido diz respeito ao facto de as macromoléculas não serem corpos rígidos. Se as forças externas de empacotamento do cristal diferirem entre o cristal do modelo de origem e o cristal onde o modelo está a ser colocado, o resultado final é uma molécula deformada. Deste modo, a otimização dos parâmetros de corpo rígido não resulta, por si só, na obtenção de um modelo final da molécula de estudo.

Assim sendo, aquando da obtenção de fases preliminares por refinamento de corpo rígido, foram utilizados dois ficheiros distintos, um ficheiro *mtz* com os fatores de estrutura observados, obtido no programa Aimless e um ficheiro *pdb* com as coordenadas atômicas do modelo homólogo. Terminada esta etapa foi então possível obter os fatores de estrutura e as fases, que permitem o cálculo de mapas de densidade eletrónica, do cristal de AioAB depois do *soaking* com antimonito. A análise dos primeiros mapas mostrou o modelo da AioAB dentro dos contornos da densidade eletrónica, como esperado.

Prosseguiu-se então, para a etapa de refinamento, crucial para a obtenção do modelo final. A etapa de refinamento tem por objetivo, o ajuste progressivo do modelo à densidade eletrónica, de forma a minimizar as diferenças entre os fatores de estrutura observados (F_{obs}) e os fatores de estrutura calculados (F_{calc}).

A estrutura foi refinada recorrendo ao programa Refmac5 do conjunto de programas CCP4 (Murshudov *et al.* 2011). Os primeiros 10 ciclos de refinamento, utilizando restrições moleculares, foram realizados utilizando os ficheiros *pdb* e *mtz* provenientes do refinamento de corpo rígido. Terminado este processo, foram obtidos dois novos ficheiros *mtz* e *pdb*, bem como uma série de parâmetros considerados cruciais para a avaliação do processo de refinamento, apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para a estrutura de AioAB com $[C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O]$.

| Parâmetro | Refinamento inicial | Refinamento final |
|--|---------------------|-------------------|
| Fator R | 0,2675 | 0,1985 |
| R_{free} | 0,2699 | 0,2314 |
| RMSD para o ângulo de ligação (°) | 2,0342 | 1,4693 |
| RMSD para o comprimento de ligação (Å) | 0,0189 | 0,0125 |
| Gráfico de Ramachandran (%) | | |
| - resíduos nas regiões mais favoráveis | | 95,42 |
| - resíduos nas regiões permitidas | - | 4,02 |
| - resíduos nas regiões não permitidas | | 0,56 |

Pela análise da Tabela 4.2, verifica-se que os parâmetros obtidos são bastante razoáveis para um primeiro refinamento, sendo possível fazer uma análise inicial dos mapas resultantes.

Deve salientar-se que o ficheiro mtz permite a visualização de vários tipos de mapas de densidade eletrónica, nomeadamente $2F_{obs}-F_{calc}$ e $F_{obs}-F_{calc}$. No mapa $2F_{obs}-F_{calc}$, o peso dado ao modelo é menor, sendo que neste mapa obtém-se uma densidade eletrónica contínua que permite o ajuste do modelo face aos dados experimentais. O mapa de densidade eletrónica $F_{obs}-F_{calc}$, também designado por mapa de diferença, resulta da subtração entre fatores de estrutura resultantes dos dados experimentais e fatores de estrutura baseados no modelo, salientando eventuais erros no modelo. Neste tipo de mapa, moléculas presentes no cristal que, no entanto, não se encontram incluídas no modelo, aparecem como densidade eletrónica extra, geralmente representada pela cor verde. Esta corresponde a densidade positiva ($F_{obs} > F_{calc}$), indicando a falta de eletrões, devendo, por isso, ser adicionados átomos nessas posições. Por sua vez, regiões incorretas do modelo são geralmente representadas por densidade de cor vermelha, correspondente a densidade negativa ($F_{obs} < F_{calc}$), indicativa do excesso de eletrões nos dados experimentais, pelo que devem ser removidas partes do modelo em que a mesma se encontre, ou ser feito o ajuste do fator de ocupação.

Um dos principais objetivos do processo de refinamento, para além de ajustar os resíduos à densidade eletrónica, foi conseguir verificar a presença de antimonito, derivado do composto $[C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O]$, e determinar a posição dos átomos envolvidos.

A referida verificação foi facilitada pela criação de um mapa anómalo. O composto $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ em solução é uma fonte de antimonito, que por apresentar um metalóide (antimónio) na sua composição, consegue absorver e difratar raios-X de forma diferente, provocando uma alteração da fase das reflexões, comparativamente a átomos como hidrogénio, oxigénio e carbono, facilitando a sua identificação. Assim sendo, recorreu-se aos programas CAD e FFT para gerar o mapa anómalo.

De seguida, recorreu-se ao programa Coot para visualizar o modelo, os mapas de densidade eletrónica ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ e $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$) e o mapa anómalo, e proceder à localização de antimónio, tendo em conta a informação supracitada.

Foi então possível visualizar a presença de densidade eletrónica no mapa $2F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$, densidade positiva no mapa $F_{\text{obs}}-F_{\text{cal}}$ e dois *blobs* de densidade anómala, um dos quais centrado no átomo de molibdénio e outro localizado a cerca de 3 Å deste. Tendo presente as informações referidas anteriormente, quando estes requisitos se verificam, significa que existe algo a acrescentar no modelo, que não corresponda aos usuais átomos presentes nos aminoácidos (carbono, hidrogénio, oxigénio e enxofre) o que, no caso em estudo, foi interpretado como sendo antimónio, modelado na forma de antimonito nas cadeias A, C, E e G, correspondentes às subunidades AioA, concluindo que o *soaking* resultou e o composto se incorporou no cristal.

Tendo verificado a presença de antimónio na estrutura foi necessário prosseguir com o processo de refinamento, visando modelar os ligandos de antimonito na densidade observada junto do centro ativo da enzima, encaixar os resíduos de proteína na densidade eletrónica, e verificar a presença de moléculas de água e outros iões, tendo em consideração os fatores de ocupação e temperatura.

Efetuararam-se vários ciclos de refinamento, com recurso ao programa Refmac5, ao fim dos quais foi possível concluir que o modelo obtido explica de forma satisfatória a densidade eletrónica, tendo em conta as estatísticas de refinamento finais, apresentadas na Tabela 4.2.

Analisando o valor de fator R, é possível observar a sua diminuição gradual ao longo do processo de refinamento, de 26,7 % para um valor final de 19,8 %. Outro parâmetro importante para avaliar o refinamento é o R_{free} , sendo também expectável que diminua progressivamente ao longo do refinamento, o que se verifica, passando de um valor inicial de 26,9 % para 23,1 %. Deste modo, a análise dos valores de fator R e R_{free} evidencia uma boa relação entre os fatores de estrutura calculados e observados, e por sua vez, uma correta construção do modelo. Adicionalmente, a comparação entre os valores de fator R e R_{free} não deve ser superior a 5 %, tal como se verifica na estrutura em estudo.

A validação da estrutura é também conseguida pela análise da geometria do modelo, dada pelos valores de RMSD e pelo gráfico de Ramachandran.

Os valores de RMSD obtidos para o comprimento de ligação (0,0125 Å) e para o ângulo de ligação (1,4693 °) encontram-se dentro do esperado (inferior a 0,02 Å e 3 °, respetivamente), o que corrobora a validade geométrica da estrutura.

No que diz respeito ao gráfico de Ramachandran, que fornece uma análise de cada resíduo em relação aos ângulos conformacionais da cadeia principal, pode confirmar-se que a grande maioria dos resíduos (3862 resíduos, 99,44 %) se encontra em regiões permitidas.

No entanto 22 resíduos (0,56 %) encontram-se em regiões não permitidas. Estes correspondem a resíduos que se encontram em regiões muito desordenadas para as quais a densidade eletrónica é muito fraca, não permitindo o seu correto posicionamento, sendo necessário realizar mais alguns ciclos de refinamento para corrigir a posição/geometria dos mesmos. Existem ainda alguns resíduos que se encontram bem encaixados na densidade eletrónica mas que por se encontrarem próximos do centro ativo, adotam uma conformação menos favorável devido a imposições estereoquímicas das pterinas, como é o caso do resíduo Glu412. Esta particularidade é característica das enzimas de Mo, tendo-se verificado em muitos modelos depositados no PDB, como por exemplo na aldeído oxidoreductase periplásmica (código de acesso PDB: 5G5G) (Correia *et al.*, 2016):

Assim sendo, por avaliação das estatísticas resultantes do refinamento, pode afirmar-se que o modelo construído explica satisfatoriamente os dados experimentais, permitindo proceder à caracterização da estrutura.

4.1.3.3. Caracterização da estrutura

As figuras apresentadas no presente subcapítulo foram geradas através da utilização do programa de visualização estrutural Pymol (DeLano, 2002). A utilização deste programa, permitiu, numa primeira instância, confirmar a estrutura secundária da arsenito oxidase descrita na literatura, com a existência de quatro domínios com uma topologia de sandwich α - β - α , na subunidade AioA, e de dois sub-domínios, constituídos essencialmente por folhas- β , na subunidade AioB.

Foi também possível visualizar o átomo de molibdénio e o centro [3Fe-4S] localizados na subunidade AioA e o centro de Rieske [2Fe-2S] na subunidade AioB. Relativamente a distâncias entre os centros redox, foi também possível verificar que as mesmas se encontram de acordo com o descrito na literatura, dado que o centro [3Fe-4S] se encontra a ~14 Å do átomo Mo, e os dois centros Fe-S distam um do outro por ~15 Å.

Conforme referido, aquando do processo de refinamento foi encontrado um local de ligação junto ao centro ativo de cada uma das subunidades AioA da proteína. Deste modo, tendo determinado a presença de densidade anómala, interpretada como sendo antimonito, foi necessário modelar este ligando tendo em atenção o fator de ocupação e o fator B. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Fatores de ocupação e fatores B dos ligandos de antimonito presentes na estrutura da AioAB.

| Cadeia polipeptídica (subunidade AioA) | Ligando | Átomo do ligando | Fator de ocupação | Fator B (Å ²) | Fator B para a totalidade dos aminoácidos (Å ²) |
|--|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|---|
| A | SbO ₃ ³⁻ | Sb | 0,7 | 27,89 | 23,29 |
| | | O1 | | 23,07 | |
| | | O2 | | 21,49 | |
| | | O3 | | 35,50 | |
| C | SbO ₃ ³⁻ | Sb | 0,7 | 30,45 | 27,34 |
| | | O1 | | 22,73 | |
| | | O2 | | 31,97 | |
| | | O3 | | 24,49 | |
| E | SbO ₃ ³⁻ | Sb | 0,7 | 29,01 | 26,80 |
| | | O1 | | 25,99 | |
| | | O2 | | 27,67 | |
| | | O3 | | 31,24 | |
| G | SbO ₃ ³⁻ | Sb | 0,7 | 29,48 | 25,38 |
| | | O1 | | 27,22 | |
| | | O2 | | 28,63 | |
| | | O3 | | 31,23 | |

Pela análise dos dados apresentados na tabela anterior, verifica-se que todos os ligandos de antimonito foram modelados com um fator de ocupação igual a 0,7, indicando que os átomos destes mesmos ligandos se encontram na posição indicada pelo modelo em 70% das moléculas do cristal. Nestas condições os valores de fator B são semelhante aos dos átomos adjacentes e ao valor para a totalidade dos átomos da cadeia polipeptídica.

Na Figura 4.9, encontra-se representada a modelação preliminar efetuada para o ligando de antimonito localizado perto do centro ativo, numa das subunidades AioA da unidade assimétrica, podendo-se, numa primeira análise, constatar que os átomos inseridos se encaixam na densidade eletrónica observada.

Como referido anteriormente, no mecanismo de reação proposto para a arsenito oxidase, pensa-se que o par de eletrões livre do arsenito realiza um ataque nucleofílico a um dos grupos oxo do átomo de molibdénio, provocando a sua redução e a formação de arsenato. Tendo em conta esta informação, verificou-se que a conformação observada para o antimonito está de acordo com esta proposta de mecanismo, constatando-se que o par de eletrões livre do átomo de antimónio se encontra direcionado para o átomo de oxigénio coordenado ao Moco.

No modelo, o átomo de Sb encontra-se a 1,7 Å do ligando hidroxilo do Mo, o que sugere que poderia ter ocorrido oxidação de antimonito e formação de antimonato (SbO₄³⁻). Para que este pressuposto se verificasse, teria de ser observada uma geometria molecular tetraédrica do átomo de antimónio, ligado aos quatro oxigénios com os ângulos de ligação de 109 °. Tendo em conta que foi observada uma geometria planar trigonal do átomo de antimónio ligado a três átomos de oxigénio (com ângulos de ligação de 120 °), consistente com a geometria de antimonito, este resultado sugere que os dados obtidos se referem ao passo reacional anterior ao ataque nucleofílico do substrato. A razão pela qual não se observa a formação do produto de reação poderá estar relacionada com a baixa velocidade de reação ou com uma baixa atividade da enzima.

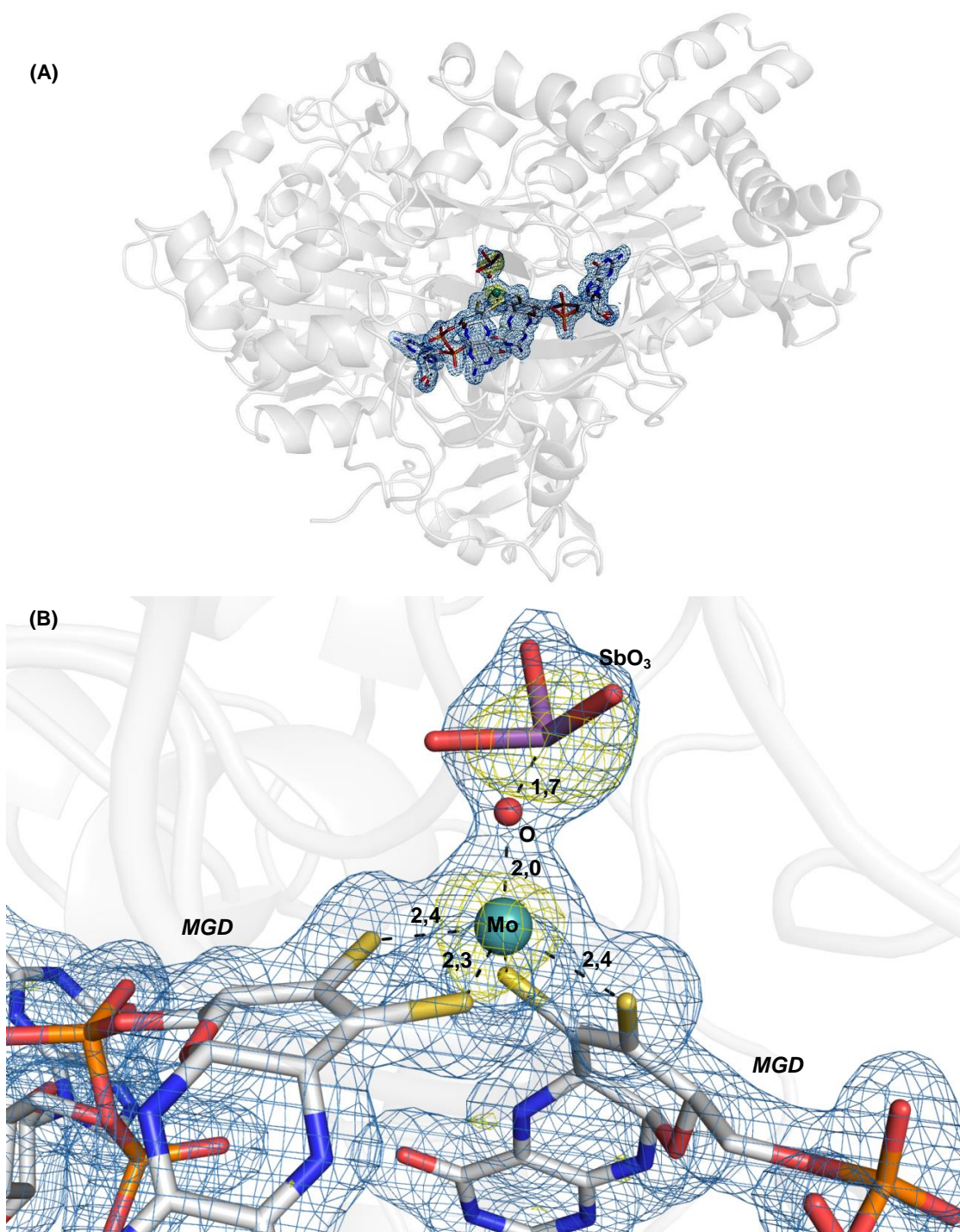


Figura 4.9. (A) Representação gráfica da subunidade AioA na estrutura do complexo $\text{SbO}_3\text{-AioAB}$. (B) Caracterização estrutural preliminar do aducto estabelecido entre antimonito e a arsenito oxidase. O íon de molibdênio no centro ativo da enzima apresenta uma geometria quadrangular piramidal, estando ligado a: dois átomos de enxofre de cada uma das pterinas (assinaladas por *MGD*) e um grupo hidroxilo (-OH). Encontra-se também representada a molécula de antimonito modelada junto do centro ativo. Os mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ e densidade anômala (a azul e amarelo, respetivamente), possuem um contorno de 1σ e 3σ , respetivamente. Código de cores: carbono – cinzento; azoto – azul; oxigénio – vermelho; enxofre – amarelo; fósforo – laranja; molibdénio – azul esverdeado; antimónio – roxo. As distâncias interatômicas encontram-se representadas em Å. A imagem foi gerada no programa Pymol (DeLano, 2002).

No que diz respeito ao centro ativo, modelou-se na densidade eletrônica um átomo de oxigênio, que juntamente com as duas moléculas de pterina, complementam uma geometria quadrangular piramidal do átomo de molibdênio, observada anteriormente para esta proteína. A distância entre este átomo e o átomo de molibdênio é de 2,0 Å, sugerindo que se poderá tratar de uma ligação simples a um grupo hidroxilo (-OH), embora o mecanismo proposto sugira a coordenação do átomo de molibdênio a dois grupos oxo (Mo=O).

Depois da modelação do átomo de oxigênio foi observada densidade eletrônica positiva junto do átomo de molibdênio. Assim sendo, tentou modelar-se a densidade através da adição de um segundo átomo de oxigênio. A presença de um segundo átomo de oxigênio (presumivelmente um ligando oxo) coordenado ao átomo de molibdênio seria consistente com o mecanismo proposto atualmente para a proteína no estado oxidado, no qual se pensa que o molibdênio se encontra coordenado por dois grupos oxo e duas moléculas de pterina, antes de ocorrer oxidação de arsenito a arsenato.

Depois de adicionar ao modelo o segundo átomo de oxigênio, junto do átomo de molibdênio do centro ativo, verificou-se a ausência de densidade eletrônica positiva ($F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$) bem como de densidade $2F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$, inicialmente observadas. No sentido de tentar modelar este segundo ligando foi feito um ajuste do fator de ocupação, baixando progressivamente o seu valor até uma ocupação de 0,4. No entanto, embora se tenha verificado a diminuição do fator B deste ligando, inicialmente bastante elevada comparativamente aos átomos na sua vizinhança, continuou a verificar-se a ausência de densidade eletrônica $2F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$. Este resultado sugere que, embora se tenha adicionado ferricianeto de potássio, visando que a proteína se encontrasse no estado oxidado, o átomo de molibdênio deverá ter sofrido redução no decurso da experiência de difração de raios-X, razão pela qual se observa apenas uma ligação a um átomo de oxigênio, em oposição à ligação a dois (na forma de grupos oxo) sugerida no mecanismo proposto, no qual o grupo oxo de maior ligação é sujeito a ataque nucleofílico pelo par de elétrons proveniente da oxidação do substrato, reduzindo o átomo de molibdênio de um estado de oxidação +VI para +IV.

Deste modo, a caracterização estrutural da arsenito oxidase nativa incubada com $[\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, permitiu verificar a presença de antimonito junto do centro ativo da enzima. Tratando-se de um análogo ao substrato fisiológico da enzima, a conformação que este adota, na qual o par livre de elétrons se encontra direcionado para o átomo de molibdênio, poderá ser semelhante à conformação do arsenito, antes de ocorrer oxidação do mesmo a arsenato, podendo contribuir para a clarificação do mecanismo da arsenito oxidase.

Contudo, será necessário continuar as investigações para se poder confirmar os resultados estruturais supracitados. Assim, deve-se, futuramente, repetir o *soaking* de cristais de AioAB nativa com $[\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, visando a obtenção de melhores dados estruturais que permitam uma caracterização mais exata dos aductos arsenito oxidase-antimonito e, a partir das conclusões de tal caracterização, clarificar o mecanismo de reação da enzima.

4.2. Estudos com mutantes AioA Q726G e AioB F108A

A realização de mutagénese dirigida nos resíduos específicos Gln726 da subunidade AioA e Phe108 da subunidade AioB da arsenito oxidase teve como objetivo inferir sobre o papel desempenhado por estes resíduos no mecanismo de reação da enzima, bem como o efeito das mutações na sua atividade, visando, para tal, a determinação da estrutura tridimensional dos mutantes e a realização de ensaios cinéticos por espectroscopia de UV/Visível.

Assim sendo, foi necessária a realização de várias etapas, nomeadamente expressão e purificação da proteína, realização de ensaios de cristalização, experiência de difração de raios-X, resolução e caracterização das estruturas e realização de ensaios de atividade enzimática.

4.2.1. Clonagem, mutagénese dirigida, expressão heteróloga em *E.coli* e purificação

Como referido anteriormente (subcapítulo 3.7), o procedimento de mutagénese dirigida para obtenção dos mutantes em estudo, foi realizado pela Professora Joanne Santini (University College of London).

A escolha específica do resíduo de glutamina na posição 726 da subunidade AioA da arsenito oxidase, deveu-se ao facto de este resíduo se localizar perto do centro ativo de molibdénio (Moco) da proteína. Neste sentido, foi realizada a sua substituição por um resíduo de glicina, um aminoácido alifático e de pequena cadeia lateral, com o intuito de perceber se o resíduo inicial desempenha um papel importante no mecanismo de transferência eletrónica, e de que forma a mutação realizada influencia a oxidação de arsenito a arsenato, ou seja, de que forma é alterada a atividade da proteína. Por sua vez, a escolha específica do resíduo de fenilalanina na posição 108 da subunidade AioB da arsenito oxidase, deveu-se ao facto de este resíduo se localizar perto do centro de Rieske da proteína, que participa no mecanismo de transferência eletrónica decorrente da oxidação de arsenito. Para este último, foi também realizada a substituição do resíduo inicial por um resíduo de alanina, com o mesmo intuito do mutante apresentado anteriormente.

Os plasmídeos utilizados na expressão heteróloga resultaram da inserção dos genes *aioBA* (*aioA* mutado no resíduo 726 para o mutante AioA Q726G, e *aioB* mutado no resíduo 108 para o mutante AioB F108A) no local de clonagem múltipla (MCS, do inglês *Multiple Cloning Site*) do vetor pPROEX-HTb, utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* (consultar subcapítulo 3.1). A transformação foi realizada em células de *E. coli* da estirpe DH5 α , pelas mesmas razões anteriormente apresentadas para a AioAB nativa (consultar subcapítulo 4.1.1).

O protocolo de expressão e purificação utilizado, descrito nos subcapítulos 3.2 e 3.3, foi semelhante ao executado para a proteína nativa. Cada um dos mutantes foi obtido a partir do extrato solúvel (proveniente da expressão em *E.coli*, lise celular e centrifugação), após realização de duas cromatografias IMAC, tendo sido a segunda IMAC efetuada após remoção da cauda de histidinas por ação da TEV, e uma cromatografia de exclusão molecular (consultar Anexo 6).

As frações recolhidas durante a cromatografia de exclusão molecular, para cada um dos mutantes, foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 4.10).

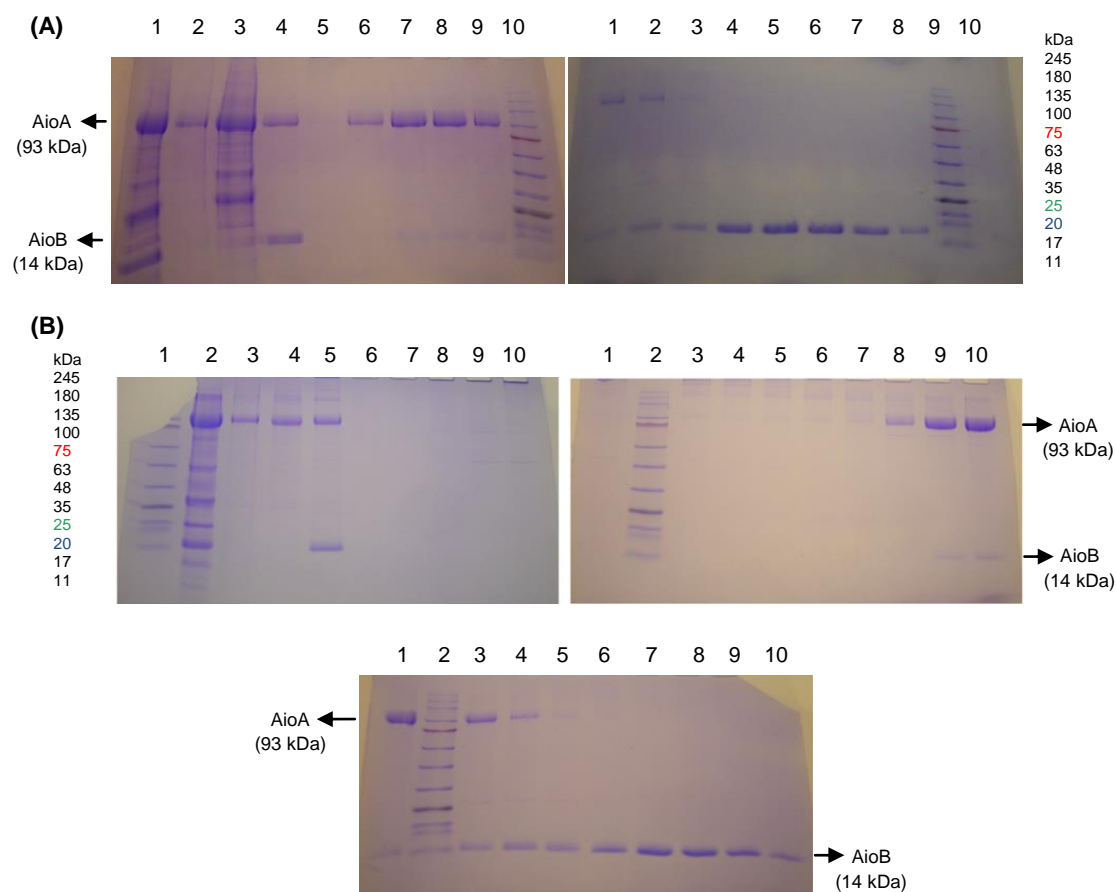


Figura 4.10. (A) Resultados de SDS-PAGE (12,5 %) obtidos para o mutante AioA Q726G. Gel da esquerda: 1- Fração dialisada; 2 e 3- Fração de contaminantes da segunda cromatografia IMAC; 4- Fração dessalinizada; 5 a 9- Frações 2, e 9 a 12 provenientes da cromatografia por exclusão molecular; 10- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II. Gel da direita: 1 a 8- Frações 13 a 20; 9- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 10- Fração 21. (B) Resultados de SDS-PAGE (12,5 %) obtidos para o mutante AioB F108A. Gel da esquerda: 1- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 2- Fração dialisada; 3 e 4- Fração de contaminantes da segunda cromatografia IMAC; 5- Fração dessalinizada; 6 a 10- Frações 6 a 10 provenientes da cromatografia por exclusão molecular. Gel da direita: 1- Fração 11; 2- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 3 a 10- Frações 12 a 19. Gel de baixo: 1- Fração 20; 2- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 3 a 10- Frações 21 a 28 (Consultar Anexo 6).

Pela análise dos resultados obtidos por eletroforese, juntaram-se as frações que continham ambas as subunidades AioA (93 kDa) e AioB (14 kDa), para cada um dos mutantes em estudo. Posteriormente, as frações foram concentradas, e a concentração final de proteína foi calculada com recurso ao aparelho Nanodrop SpectraMax190, encontrando-se os resultados sumariados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Concentração final de proteína após purificação. Para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A, foram considerados valores de coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280\text{nm}}$) teóricos de $136883 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $136887 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respetivamente, calculados através da ferramenta bioinformática ProtParam.

| Mutante | Volume final | Concentração final |
|------------|------------------|--------------------|
| AioA Q726G | 50 μL | 15,89 mg/mL |
| AioB F108A | 60 μL | 13,17 mg/mL |

Em forma de conclusão, foi possível obter proteína com elevado grau de pureza, utilizando o protocolo descrito anteriormente para expressão heteróloga e purificação. Assim sendo, progrediu-se com o trabalho experimental para a realização de ensaios de cristalização, com vista à determinação da estrutura tridimensional dos mutantes em estudo.

4.2.2. Cristalografia de raios-X

4.2.2.1. Ensaios de cristalização e experiência de difração de raios-X

Como referido anteriormente (subcapítulo 3.4), aquando da realização dos ensaios de cristalização foram utilizadas as condições de cristalização previamente determinadas e otimizadas no Laboratório de Cristalografia de Proteínas, tal como se fez para a proteína nativa.

Os ensaios de cristalização foram realizados em caixas de cristalização de 24 reservatórios, a 4°C , recorrendo ao método de difusão de vapor e técnica de gota assente. Tendo verificado para a proteína nativa, o aparecimento de melhores cristais para as condições em que se utilizou uma mistura de 100% ou 80% da solução de 0,1M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com 0% ou 20%, respetivamente, da solução de 0,1M tampão HEPES de sódio pH 8,0; 2% PEG 400 e 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, as mesmas condições foram utilizadas aquando da realização dos ensaios de cristalização para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A.

Adicionalmente, tendo-se verificado, no decurso de uma avaria da câmara de 4°C , o aparecimento e crescimento de cristais, foram realizados vários ensaios de cristalização em que foi variada a temperatura (consultar Tabela 3.3).

Verificou-se que todas as tentativas conduziram ao aparecimento de cristais após variação da temperatura, à exceção do ensaio em que a proteína foi inicialmente incubada a 30 °C durante 5 minutos e as gotas foram feitas a 4 °C (consultar Tabela 3.3, ensaio 3). Neste caso, houve formação de um precipitado e a ausência de cristais, que deverá ter sido devido à diminuição acentuada da temperatura de 30 °C (temperatura de incubação) para 4 °C (temperatura de cristalização).

As condições descritas no ensaio 2 da Tabela 3.3, no qual foi feita a incubação da proteína a 30 °C, realização das gotas a 20 °C e posterior transferência da placa para 4 °C, permitiram o aparecimento de alguns cristais de pequena dimensão embora se tenha também verificado maioritariamente a formação de um precipitado. Deste modo, por comparação com as condições utilizadas no ensaio 3, foi possível verificar que no ensaio 2 a diminuição de temperatura menos acentuada favorece ligeiramente o aparecimento de cristais, embora se verifique em ambos os casos a formação de precipitado, o que sugere, por sua vez, que a incubação inicial a 30 °C conduz à desnaturação da proteína.

Posto isto, realizaram-se novos ensaios em que foi efetuado um ciclo de subida e descida de temperatura (consultar Tabela 3.3, ensaios 1, 4 e 5), na tentativa de reproduzir a alteração de temperatura aquando da avaria da câmara, através dos quais se verificou o aparecimento de vários cristais nas gotas.

No entanto, foram observadas diferenças na dimensão dos cristais obtidos. Nos ensaios em que se realizou uma alteração de temperatura menos gradual (consultar Tabela 3.3, ensaios 1 e 4), variando a temperatura entre 4 °C, 20 °C e 30 °C, verificou-se o aparecimento de inúmeros cristais de pequenas dimensões, enquanto que no ensaio em que se realizou uma alteração de temperatura menos significativa, variando a mesma entre 4 °C, 10 °C, 16 °C, 22 °C e 30 °C (consultar Tabela 3.3, ensaio 5), se verificou o aparecimento de um menor número de cristais mas de maior dimensão.

Podemos então afirmar que a temperatura é um fator determinante na realização de ensaios de cristalização da Aio, tendo-se verificado que a variação de temperatura em intervalos maiores favorece o aparecimento de cristais, enquanto que a variação em intervalos mais reduzidos favorece o seu crescimento, como se pode visualizar na Figura 4.11.

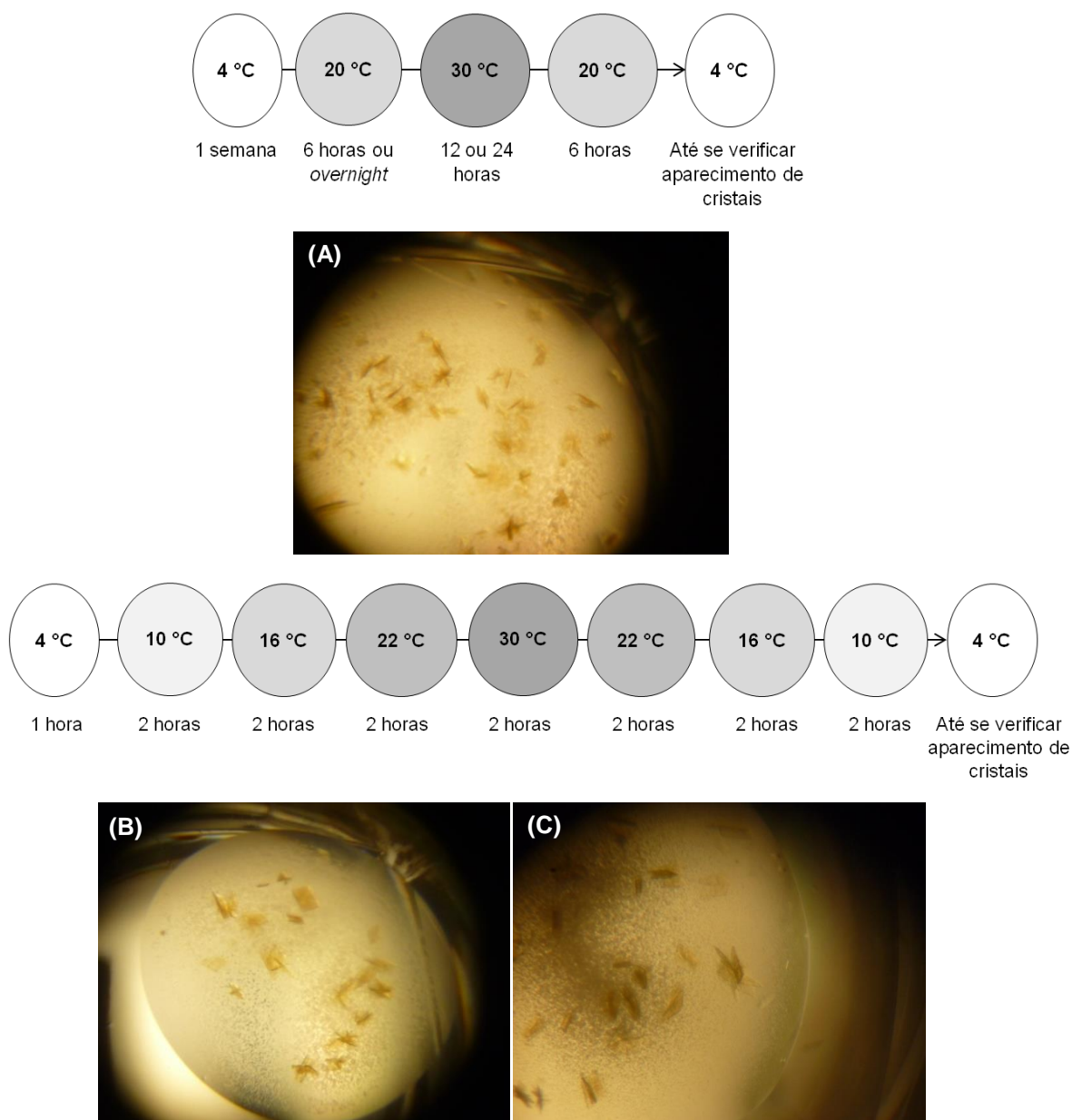


Figura 4.11. (A) Cristais de AioA Q726G obtidos a 4 °C pela técnica de gota assente, com tamanho aproximado de 0,1 x 0,1 x 0,1 mm, após variação da temperatura entre 4 °C, 20 °C e 30 °C. (B) Cristais de AioA Q726G obtidos a 4 °C, com tamanho aproximado de 0,2 x 0,2 x 0,1 mm, após variação da temperatura entre 4 °C, 10 °C, 16 °C, 22 °C e 30 °C. (C) Cristais de AioB F108A obtidos a 4 °C, com tamanho aproximado de 0,2 x 0,2 x 0,1 mm, após variação da temperatura entre 4 °C, 10 °C, 16 °C, 22 °C e 30 °C. Os cristais foram obtidos utilizando 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou uma mistura de 80 % de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 7,0; 2% PEG 400 e 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 20 % de 0,1 M tampão HEPES de sódio pH 8,0; 2% PEG 400 e 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Assim sendo, o ensaio em que se realizou a alteração de temperatura menos significativa, revelou-se o mais eficaz para a obtenção de cristais mais robustos e de manipulação mais fácil, adequados à experiência de difração de raios-X.

Os melhores cristais, de cada um dos mutantes, foram estabilizados, transferidos para uma solução crio-protetora e congelados em azoto líquido para posterior difração por radiação de sincrotrão nas linhas ID23-1 do ESRF (Grenoble, França) e PXIII do SLS (Villigen, Suíça) (Figura 4.12).

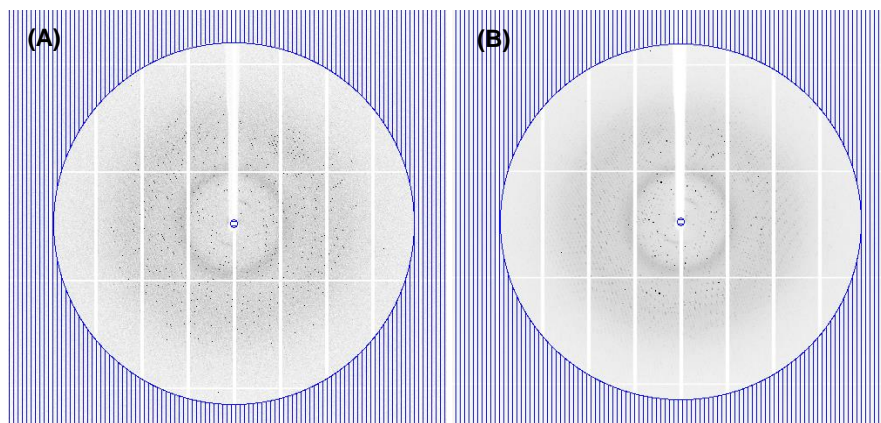


Figura 4.12. Padrões de difração obtidos para os cristais de AioA Q726G (A) e AioB F108A (B). (A) A experiência de difração foi efetuada na linha ID23-1 (ESRF), e o conjunto de dados recolhido e apresentado tem uma resolução máxima de 2,18 Å. (B) A experiência de difração foi efetuada na linha PXIII (SLS), e o conjunto de dados recolhido e apresentado tem uma resolução máxima de 2,20 Å. Os dados dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A foram recolhidos a um comprimento de onda fixo de 0,992 e 1,00 Å, respetivamente.

Repetindo a abordagem descrita anteriormente para os cristais de AioAB nativa, os dados de difração dos mutantes foram processados, encontrando-se as estatísticas deste processamento apresentadas na Tabela 4.5.

Como seria de esperar, os cristais dos mutantes em estudo pertencem ao mesmo grupo espacial que os cristais de proteína nativa (P22₁2₁) apresentando as mesmas constantes da célula unitária e conteúdo de solvente.

Tabela 4.5. Estatísticas de qualidade dos dados de difração dos cristais dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A. Os valores entre parênteses correspondem à camada externa de resolução.

$$R_{pim} = \frac{\sum_h \left(\frac{1}{N-1} \right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}} \quad \text{Multiplicidade} = \frac{\text{número total de reflexões}}{\text{número total de reflexões únicas}}$$

$$V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

| Parâmetros | AioA Q726G | AioB F108A |
|--|---|--|
| Resolução (Å) | 49,22-2,18 (2,22-2,18) | 49,55-2,20 (2,24-2,20) |
| $\langle I/\sigma(I) \rangle$ | 5,6 (2,1) | 8,2 (1,5) |
| CC1/2 | 0,969 (0,467) | 0,988 (0,590) |
| Número total de reflexões | 1703047 (82572) | 3418983 (157903) |
| Número de reflexões únicas | 253576 (12422) | 247069 (12160) |
| R _{pim} (%) | 11,6 (48,2) | 9,8 (52,4) |
| Multiplicidade | 6,7 (6,6) | 13,8 (13,0) |
| Completeness (%) | 100,0 (99,9) | 100,0 (100,0) |
| Número de moléculas na unidade assimétrica | 2 | 2 |
| Coefficiente de Matthews (Å ³ / Dalton) | 2,78 | 2,78 |
| Conteúdo de solvente (%) | 55,84 | 55,82 |
| Grupo espacial | P22 ₁ 2 ₁ | P22 ₁ 2 ₁ |
| Constantes da célula unitária (Å, °) | a= 141,6; b= 148,8; c= 232,1 α=β= γ=90 | a= 141,5; b= 148,8; c= 232,2 α= β= γ=90 |

Pela análise das estatísticas apresentadas foi possível comprovar a qualidade dos dados de ambos os mutantes, aplicando os critérios definidos anteriormente para os dados da AioAB nativa (consultar subcapítulo 4.1.3.1), possibilitando a passagem para a etapa seguinte de resolução da estrutura tridimensional dos mutantes em estudo.

4.2.2.2. Resolução das estruturas e refinamento

As estruturas dos dois mutantes em estudo foram resolvidas recorrendo a um refinamento de corpo rígido, de igual modo ao descrito anteriormente para a proteína nativa (consultar subcapítulo 4.1.3.2).

Tendo em conta que se pretendia visualizar a mutação da Gln726, no mutante AioA Q726G, este resíduo foi removido das quatro cadeias polipeptídicas correspondentes à subunidade AioA, do ficheiro pdb utilizado como modelo homólogo. Para o mutante AioB F108A, foi realizado o mesmo procedimento. Para ambos os mutantes, foram ainda removidas as moléculas de água e iões presentes, utilizando a cadeia polipeptídica, os centros metálicos e os cofatores (*bis-MGD*) do átomo de molibdénio para o cálculo do mapa de densidade eletrónica.

Terminada esta etapa foi então possível obter os fatores de estrutura e as fases, que permitiram o cálculo de mapas de densidade eletrónica dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A, tornando possível a progressão para a etapa de refinamento.

Antes de continuar o processo de refinamento confirmou-se a existência de densidade eletrónica no mapa $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ para os resíduos mutados. Para tal, recorreu-se ao programa de visualização Coot, utilizando os ficheiros mtz e pdb obtidos anteriormente no programa Refmac5. Verificou-se a presença de densidade eletrónica positiva correspondente a um resíduo de Gly para os resíduos 726 da subunidade AioA, e Ala para os resíduos 108 da subunidade AioB, nos mutantes AioA Q726G e AioB F108A, respetivamente.

Tendo em conta que os ficheiros pdb utilizados como modelos não possuíam coordenadas atómicas dos resíduos mutados, foi possível confirmar que a densidade positiva observada era unicamente proveniente dos dados experimentais, não estando afetada por qualquer *model bias*, o que evidencia o sucesso na resolução das estruturas dos mutantes em estudo.

Depois da inserção dos resíduos mutados, procedeu-se ao refinamento das estruturas através da realização de vários ciclos de construção e refinamento dos modelos, através de alterações no Coot e utilização do Refmac5, ao fim dos quais se concluiu que os modelos construídos explicavam satisfatoriamente os dados experimentais, como se pode verificar através das estatísticas de refinamento finais indicadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Estatísticas de refinamento inicial e final obtidas para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A.

| Parâmetro | Mutante AioA Q726G | | Mutante AioB F108A | |
|--|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Refinamento inicial | Refinamento final | Refinamento inicial | Refinamento final |
| Fator R | 0,3365 | 0,2830 | 0,2428 | 0,1893 |
| R _{free} | 0,3397 | 0,3223 | 0,2421 | 0,2265 |
| RMSD para o ângulo de ligação (°) | 1,9637 | 1,7569 | 2,1148 | 2,0262 |
| RMSD para o comprimento de ligação (Å) | 0,0205 | 0,0148 | 0,0223 | 0,0187 |
| Gráfico de Ramachandran (%) | | | | |
| - resíduos nas regiões mais favoráveis | | 94,41 | | 95,06 |
| - resíduos nas regiões permitidas | - | 4,74 | - | 4,40 |
| - resíduos nas regiões não permitidas | | 0,85 | | 0,54 |

Em suma, avaliando as estatísticas resultantes do refinamento das estruturas dos mutantes em estudo, pode afirmar-se que a construção dos modelos foi, no global, bem sucedida, aplicando os critérios definidos anteriormente (consultar subcapítulo 4.1.3.2). Embora as estruturas se encontrem atualmente em fase de refinamento foi possível avançar para a etapa final de caracterização.

4.2.2.3. Caracterização das estruturas

A análise inicial dos modelos permitiu verificar que os resíduos mutados se encaixam corretamente na densidade eletrônica, apresentando um valor para o fator de ocupação igual a 1, indicando que os átomos destes resíduos se encontram na posição indicada pelo modelo em todas as moléculas do cristal, como seria de esperar. No que diz respeito ao fator B, os resíduos mutados, em cada uma das estruturas, apresentam valores próximos aos valores de fator B para resíduos vizinhos e para a totalidade dos aminoácidos, evidenciando a correta posição dos átomos e assim, o ajuste bem sucedido dos resíduos adicionados.

Na Figura 4.13 (A) encontra-se representada a estrutura obtida para o mutante AioA Q726G, destacando o resíduo de glicina na posição 726 e o centro ativo da enzima, constituído pelo átomo de molibdênio coordenado por quatro átomos de enxofre de duas moléculas de molibdopterina e um átomo de oxigênio, dando origem a uma geometria piramidal quadrangular. Adicionalmente, por comparação com a estrutura de AioAB nativa (Figura 4.13 (B)), obtida anteriormente no laboratório de Cristalografia de Proteínas, foi possível verificar que o átomo de molibdênio apresenta a mesma geometria pentacoordenada (duas moléculas MGD e um ligando oxo) e não se verificam alterações na estrutura global da proteína.

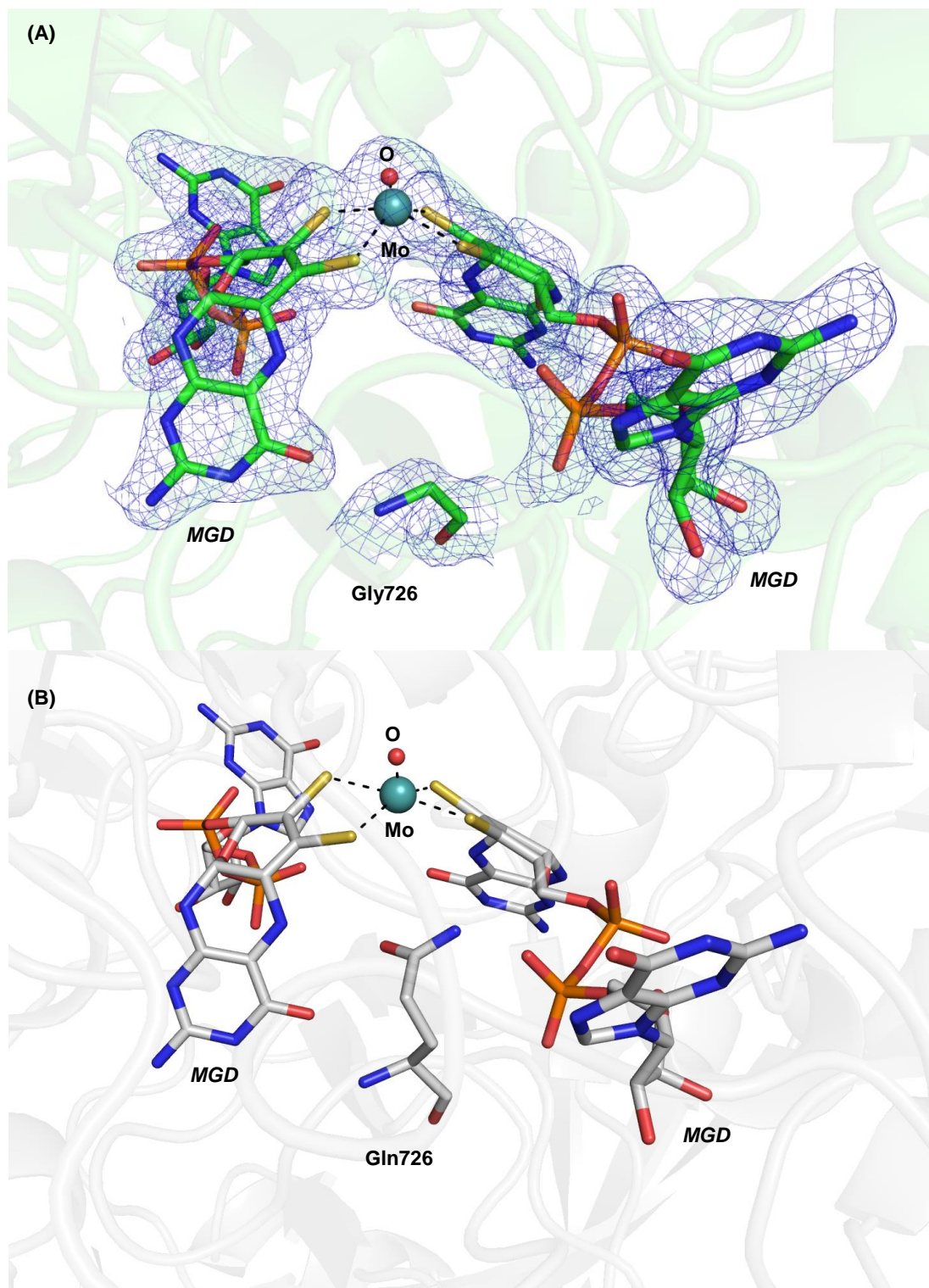


Figura 4.13. Representação do centro ativo da subunidade AioA nas estruturas do mutante AioA Q726G (A) e nativa (B) da arsenito oxidase de NT-26. Na figura encontra-se representado o átomo de molibdênio coordenado por duas pterinas e um átomo de oxigênio, numa geometria quadrangular piramidal. Encontra-se também representado o resíduo 726, Gly no mutante AioA Q726G e Gln na estrutura nativa. O mapa $2F_o - F_c$ (a azul) apresenta um contorno de 1σ . Código de cores: carbono – cinzento; azoto – azul; oxigênio – vermelho; enxofre – amarelo; fósforo – laranja; molibdênio – azul esverdeado. As imagens foram geradas no programa Pymol (DeLano, 2002).

Dada a proximidade do resíduo mutado ao centro ativo da enzima, é possível que a substituição do resíduo de glutamina por glicina afete a atividade da enzima. Como foi referido anteriormente (consultar subcapítulo 1.3.2), no mecanismo proposto atualmente para a arsenito oxidase, quando ocorre oxidação de arsenito a arsenato, o átomo de molibdénio é reduzido, passando de um estado de oxidação de +VI para +IV. O estado de oxidação inicial do molibdénio é restaurado quando os dois eletrões são transferidos para o centro metálico [3Fe-4S], de seguida para o centro de Rieske, e por último, para um aceitador de eletrões solúvel.

Assim sendo, tendo em conta a substituição da Gln726, que possui uma cadeia lateral polar que favorece a transferência eletrónica, por Gly, um aminoácido apolar de pequena cadeia lateral, é provável que a cadeia de transferência eletrónica se torne menos eficiente, fazendo com que o átomo de molibdénio permaneça mais tempo no estado reduzido, e consequentemente com que a enzima se torne menos ativa.

Por sua vez, na Figura 4.14 (A) encontra-se representada a estrutura obtida para o mutante AioB F108A, destacando o resíduo de alanina na posição 108 e os resíduos Cys103, Pro104, His105, Lys106, Gly107, Gly123 e His124, localizados junto do centro de Rieske.

Por comparação com a estrutura de AioAB nativa (Figura 4.14 (B)), foi possível visualizar a ausência de alterações na estrutura global da proteína, de igual modo ao que foi obtido para o mutante AioA Q726G.

No entanto, foi possível constatar que a substituição do resíduo Phe108 por um resíduo de alanina torna o centro de Rieske mais exposto ao solvente. O resíduo de Phe na estrutura nativa, mais volumoso comparativamente ao resíduo Ala108 na estrutura do mutante, protege melhor o centro metálico do solvente, tornando-o menos acessível.

Assim sendo, no mutante AioB F108A, devido ao aumento de exposição do centro de Rieske, é possível que a transferência eletrónica entre o centro [3Fe-4S] e o centro de Rieske, e entre este último e o aceitador final de eletrões se torne mais rápida e eficiente, tendo em conta o mecanismo proposto para a reação catalisada pela arsenito oxidase, referido anteriormente.

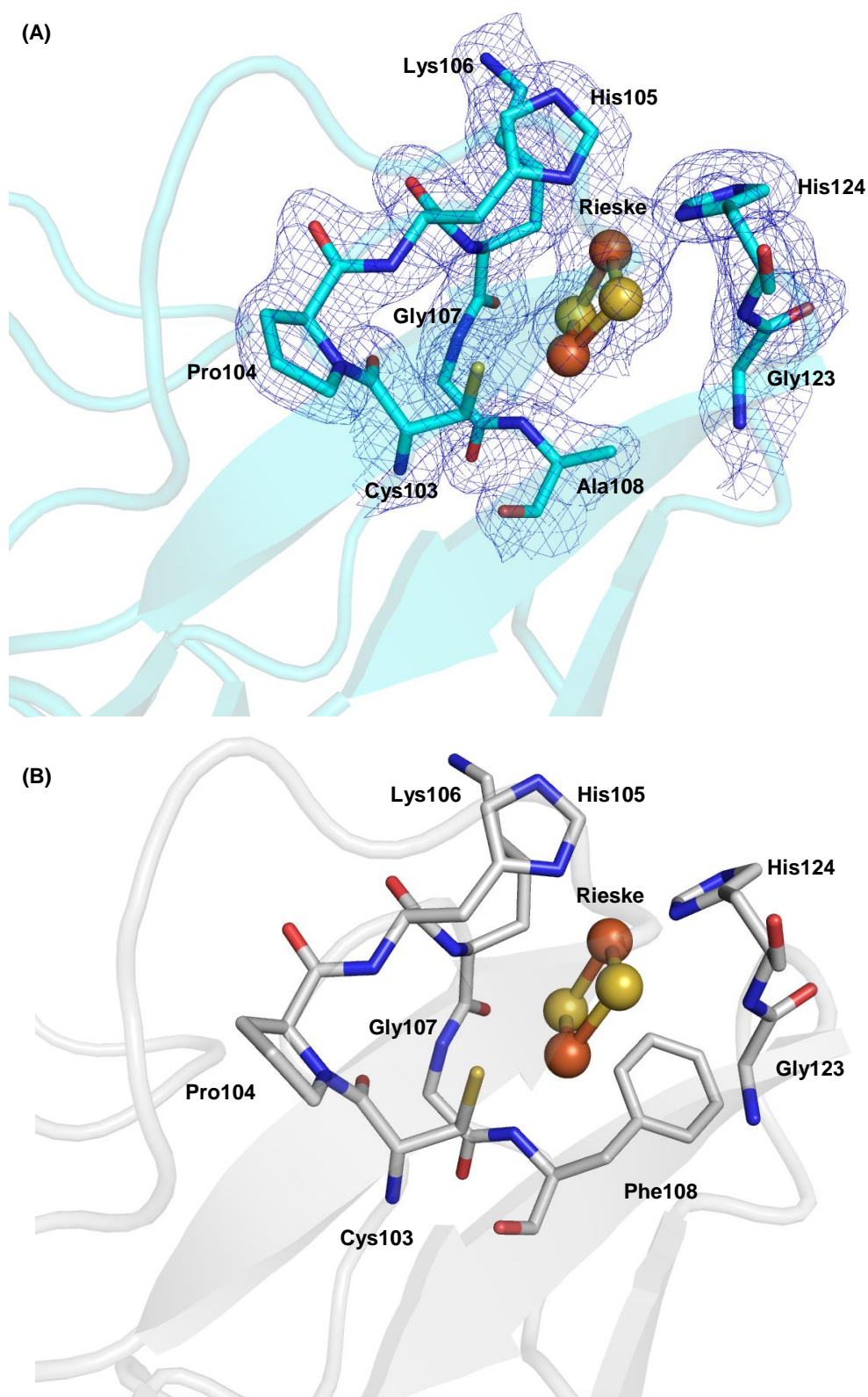


Figura 4.14. Representação do centro de Rieske da subunidade AioB nas estruturas do mutante AioB F108A **(A)** e na estrutura nativa **(B)** da arsenito oxidase de NT-26. O resíduo na posição 108, Phe na estrutura nativa e Ala no mutante AioB F108A encontra-se representado. Os resíduos Cys103, Pro104, His105, Lys106, Phe108, Gly107, Gly123 e His124 encontram-se localizados à volta do centro metálico de Rieske. O mapa $2F_o - F_c$ (a azul) apresenta um contorno de 1σ . Código de cores: carbono – cinzento; azoto – azul; oxigénio – vermelho; enxofre – amarelo; ferro – castanho. As imagens foram geradas no programa Pymol (DeLano, 2002).

4.2.3. Ensaios cinéticos por Espectroscopia de UV/Visível

Os ensaios cinéticos foram realizados para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A, com o principal objetivo de determinar a atividade específica da enzima e inferir o efeito das mutações realizadas no mecanismo de transferência eletrônico envolvido.

O procedimento experimental descrito anteriormente (consultar subcapítulo 3.7) foi baseado em informação descrita na literatura (Warellow *et al.*, 2013) e em informação fornecida pela Professora Joanne Santini (Institute of Structural and Molecular Biology, University College of London).

Como foi referido anteriormente, pensa-se que o *turnover* catalítico da arsenito oxidase se inicie com a oxidação de arsenito a arsenato no centro de Mo. Tendo em conta que o arsenato é libertado antes de o aceitador final de eletrões se ligar à proteína na forma reduzida, torna-se possível realizar estudos de atividade enzimática através monitorização da redução do aceitador de eletrões, tendo utilizado DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), um aceitador de eletrões não-fisiológico (Figura 4.15).

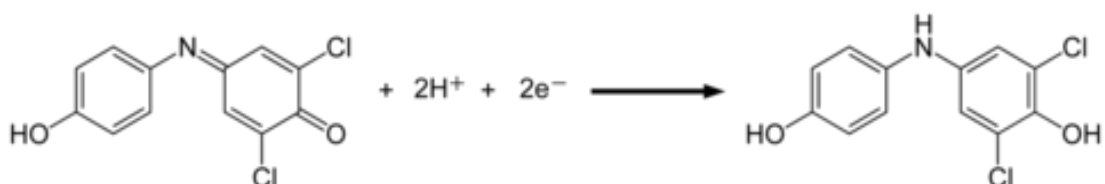


Figura 4.15. Reação de redução de DCPIP, desencadeada pela oxidação de arsenito a arsenato.

Os ensaios cinéticos de espectroscopia de UV/Visível foram conduzidos a uma temperatura de 25 °C e foram realizados através da monitorização da redução de DCPIP a um comprimento de onda de 600 nm. Como substrato da reação foi utilizada uma solução de arsenito de sódio (Na₃AsO₃) a pH 8,0.

Os ensaios cinéticos foram primeiramente realizados para a enzima nativa, AioAB, permitindo, posteriormente, a comparação e avaliação da alteração da atividade nos mutantes em estudo. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.16.

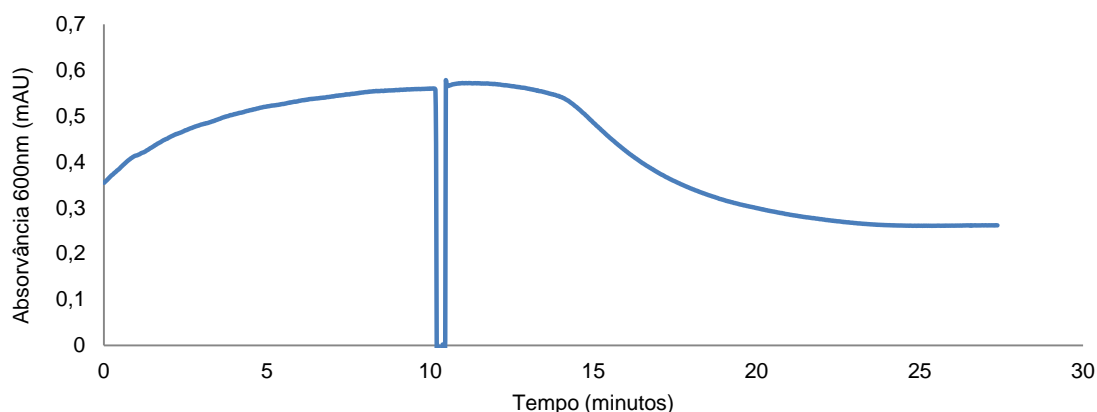


Figura 4.16. Representação gráfica do ensaio cinético para a AioAB nativa, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 µg de proteína numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 µM de DCPIP. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de cerca de 10 minutos), adicionou-se 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0. O resultado apresentado corresponde a um dos replicados técnicos realizado (consultar Anexo 7, Figura 7.8), e o ensaio foi conduzido a 25 °C.

Pela análise da Figura 4.16, verifica-se um período inicial de estabilização da solução de proteína e DCPIP. Após estabilização da absorvância a 600 nm, ao fim de cerca de 10 minutos, foi adicionado o substrato da reação, 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0, verificando-se que após adição do mesmo ocorreu redução de DCPIP, visível por decréscimo da absorvância ao longo do tempo. Para obtenção do valor de atividade específica, foi determinado o declive no período em que a velocidade da reação é máxima e foi calculada a atividade específica para cada um dos ensaios realizados, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos da AioAB nativa, realizados na forma de replicados técnicos a 25 °C. Para os cálculos de atividade de atividade específica foi considerado um valor de ϵ_{600nm} (DCPIP) = 23 M⁻¹ cm⁻¹ (Warellow *et al.*, 2013) e uma concentração final de proteína no ensaio de 20 µg/mL (consultar Anexo 7, Figura 7.9).

| Ensaio | Declive (min ⁻¹) | Atividade (mM ⁻¹ min ⁻¹) | Atividade específica (µmol ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹) | Média de atividade específica (µmol ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹) |
|--------|------------------------------|---|---|--|
| 1 | 0,0682 | 2,965 | 0,1483 | 0,1141 |
| 2 | 0,0485 | 2,109 | 0,1054 | |
| 3 | 0,0408 | 1,774 | 0,0887 | |

Por comparação inicial entre o valor de atividade específico obtido, 0,1141 µmol⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ e o valor apresentado na literatura (Warellow *et al.*, 2013), 1,7 µmol⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹, pode desde logo verificar-se uma diferença notória, evidenciando que a proteína utilizada aquando da realização dos ensaios cinéticos se encontra significativamente menos ativa. É, pois, possível que tenha ocorrido uma perda substancial de atividade da proteína durante a etapa de purificação ou durante a realização dos ensaios cinéticos.

Posto isto, a otimização das condições de purificação e a variação de condições dos ensaios cinéticos com vista à sua otimização revela-se crucial até que sejam obtidos valores semelhantes aos da literatura.

Apesar dos valores obtidos para a proteína nativa diferirem significativamente dos mesmos publicados na literatura (Warellow *et al.*, 2013), foram realizados ensaios cinéticos para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A, repetindo o mesmo procedimento utilizado para a proteína nativa, no sentido de caracterizar o efeito das mutações na atividade específica. O resultado obtido para o mutante AioA Q726G encontra-se apresentado na Figura 4.17.

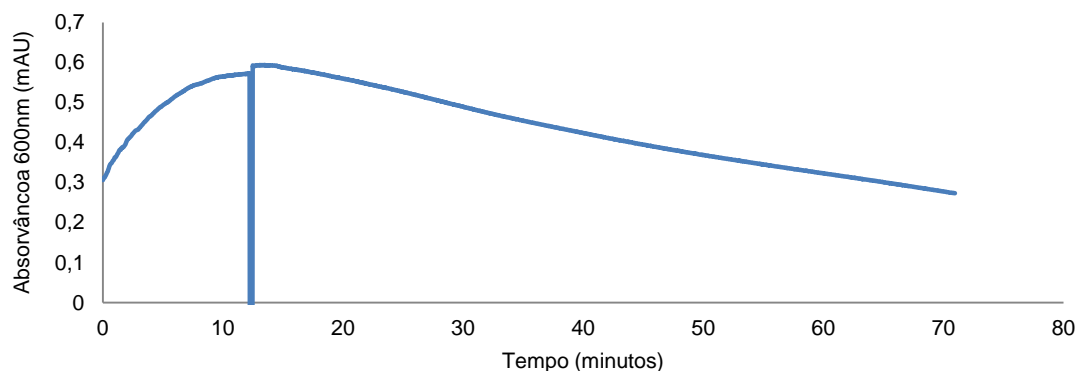


Figura 4.17. Representação gráfica do ensaio cinético para o mutante AioA Q726G, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 µg de proteína numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 µM de DCPIP. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de cerca de 12 minutos), adicionou-se 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0. O resultado apresentado corresponde a um dos replicados técnicos realizado (consultar Anexo 7, Figura 7.10), e o ensaio foi conduzido a 25 °C.

Pela análise da Figura 4.17, observa-se, para o mutante de estudo, um decréscimo bastante mais lento da absorvância a 600nm, comparativamente à proteína nativa (Figura 4.16), inferindo desde logo que a redução de DCPIP é mais lenta e que a mutação realizada se deverá traduzir no decréscimo de atividade da proteína.

Para obtenção do valor de atividade específica foi primeiramente calculado, para os vários replicados técnicos, o declive na velocidade máxima da reação, que ocorreu em média 3-5 minutos após adição da solução de arsenito. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos do mutante AioA Q726G, realizados na forma de replicados técnicos a 25 °C. Para os cálculos de atividade de atividade específica foi considerado um valor de ϵ_{600nm} (DCPIP) = $23 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Warellow *et al.*, 2013) e uma concentração final de proteína no ensaio de 20 µg/mL (consultar Anexo 7, Figura 7.11).

| Ensaio | Declive (min^{-1}) | Atividade ($\text{mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) | Atividade específica ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) | Média de atividade específica ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) |
|--------|-------------------------------|---|--|---|
| 1 | 0,0110 | 0,4783 | 0,0239 | 0,0179 |
| 2 | 0,0062 | 0,2696 | 0,0135 | |
| 3 | 0,0075 | 0,3261 | 0,0163 | |

Apesar do valor de atividade específica obtido experimentalmente para a proteína nativa diferir significativamente do valor publicado na literatura, foi feita a comparação deste primeiro com os valores de atividade específica obtidos para os mutantes em estudo.

Comparando os valores de atividade específica da proteína nativa e do mutante AioA Q726G, conclui-se haver um decréscimo acentuado da atividade da enzima, indicativo da perda quase total de atividade. Deste modo, é possível aferir que a substituição de Gln726 por Ala726 na subunidade AioA, parece afetar significativamente a atividade da arsenito oxidase, provocando uma diminuição da mesma.

Tendo em conta a proximidade deste resíduo ao centro ativo da enzima, tudo indica que a substituição de glutamina por glicina influencia a atividade da enzima, uma vez que a cadeia de transporte eletrónico se torna menos eficiente, o que, consequentemente faz com que o átomo de molibdénio permaneça mais tempo no estado reduzido, tornando assim a enzima menos ativa por se tornar mais lenta na realização de reações redox sucessivas.

No entanto, tendo em conta que os resultados obtidos são preliminares, a ausência de valores publicados na literatura para o mutante em estudo, e tendo em conta a discrepância entre o valor obtido experimentalmente para a proteína nativa ($0,1141 \mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) e o valor descrito na literatura ($1,7 \mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), não pode ser excluída a possibilidade de ter havido erros aquando da realização dos ensaios. A realização de novos ensaios cinéticos torna-se fundamental para poder verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e poder avaliar o efeito da mutação no resíduo 726 da subunidade AioA.

De igual modo ao realizado para a AioAB nativa e mutante AioA Q726G, foram realizados ensaios cinéticos para o mutante AioB F108A. Pela análise da Figura 4.18, visualiza-se novamente um período inicial de estabilização da solução de proteína e DCPIP. Após estabilização da absorvância a 600 nm, ao fim de cerca de 8 minutos, foi adicionado o substrato da reação, tendo-se verificado que após a adição do mesmo ocorreu redução de DCPIP.

É também possível verificar, depois da adição de substrato, um decréscimo bastante mais rápido da absorvância a 600 nm, comparativamente à proteína nativa (consultar Figura 4.16).

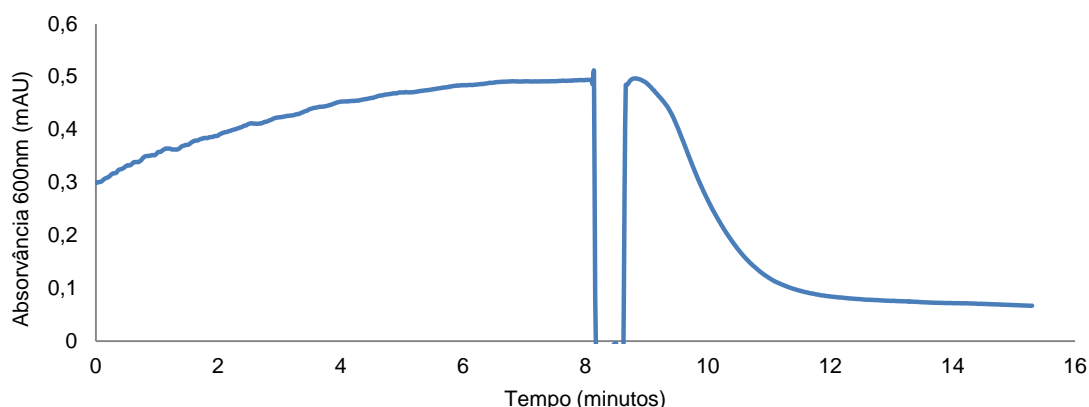


Figura 4.18. Representação gráfica do ensaio cinético para o mutante AioB F108A, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 μg de proteína numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 μM de DCPIP. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de cerca de 8 minutos), adicionou-se 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0. O resultado apresentado corresponde a um dos replicados técnicos realizado (consultar Anexo 7, Figura 7.12), e o ensaio foi conduzido a 25 °C.

Foi novamente calculado, para os vários replicados técnicos, o declive no período de velocidade máxima da reação, que ocorreu em média 1-3 minutos após adição da solução de arsenito, e a atividade específica, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos do mutante AioB F108A, realizados na forma de replicados técnicos a 25 °C. Para os cálculos de atividade de atividade específica foi considerado um valor de ϵ_{600nm} (DCPIP) = 23 M⁻¹ cm⁻¹ (Warellow *et al.*, 2013) e uma concentração final de proteína no ensaio de 20 µg/mL (consultar Anexo 7, Figura 7.13).

| Ensaio | Declive (min ⁻¹) | Atividade (mM ⁻¹ min ⁻¹) | Atividade específica (µmol ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹) | Média de atividade específica (µmol ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹) |
|--------|------------------------------|---|---|--|
| 1 | 0,3201 | 13,9173 | 0,6959 | 0,6774 |
| 2 | 0,2955 | 12,8478 | 0,6424 | |
| 3 | 0,3192 | 12,8782 | 0,6939 | |

Por comparação dos valores obtidos experimentalmente para a proteína nativa e para o mutante F108A, 0,1141 e 0,6774 µmol⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹, respetivamente, verifica-se um aumento significativo da atividade específica. Tudo indica que a mutação realizada resulta no aumento de atividade da enzima, uma vez que a substituição da fenilalanina por alanina no resíduo 108 torna o centro de Rieske mais exposto ao solvente e consequentemente, a transferência de eletrões mais rápida e eficiente, como foi possível visualizar na estrutura obtida por cristalografia de raios-X.

O valor obtido é significativamente inferior ao publicado para a proteína nativa, mas esta diferença deve ser vista como explicado anteriormente, uma perda significativa de atividade durante a purificação e realização dos ensaios cinéticos.

Os resultados aqui descritos encontram-se de acordo com os dados obtidos pelos colaboradores deste projeto (dados não publicados), onde se verifica a mesma tendência para as atividades dos mutantes.

Assim sendo, é possível reforçar que a mutação realizada no resíduo 726 da subunidade AioA conduz a um decréscimo drástico da atividade da enzima, enquanto que a mutação realizada no resíduo 108 da subunidade AioB conduz ao aumento de atividade, tendo em conta os pressupostos referidos anteriormente.

4.3. Mutagénesse dirigida da subunidade AioA

Tendo em conta os resultados obtidos para os mutantes AioA Q726G e AioB F108A, a realização de mutagénesse dirigida em resíduos específicos da arsenito oxidase de *α-proteobacterium Rhizobium* NT-26 teve como objetivo a obtenção de novos mutantes para o posterior estudo de efeito das mutações em outros resíduos alvo que poderão influenciar o mecanismo de transferência eletrónica e a atividade da enzima. No presente estudo tentou-se obter os mutantes D169A/N e E453A/Q. Esta etapa foi inicialmente realizada no laboratório da Professora Joanne Santini, sob a sua orientação.

A escolha dos resíduos 169 e 453 da subunidade AioA deveu-se ao fato de estes se localizarem perto do cofator de molibdênio (Moco) e do centro de [3Fe-4S], podendo estar de certa forma envolvidos no mecanismo reacional da arsenito oxidase. A substituição dos resíduos por alanina visou aferir o seu eventual papel na estabilização do substrato, aquando da ligação ao centro ativo. Por sua vez, a substituição dos mesmos por asparagina e glutamina, em D169N e E453Q, respetivamente, poderá mostrar qual a importância de resíduos carregados negativamente perto do centro ativo.

Como mencionado anteriormente no subcapítulo 3.7, os genes *aioAB* foram previamente clonados no vetor de expressão pPROEX-HTb, utilizando o plasmídeo recombinante como molde para a mutação dos resíduos Asp169 e Glu453 pelo método de PCR utilizando o *kit* de mutagénese dirigida QuikChange® II XL. O vetor foi utilizado para clonar cada um dos mutantes em estudo, utilizando duas sequências de oligonucleótidos (*primers*) complementares que continham a mutação desejada (D169A, D169N, E453A e E453Q). A digestão da cadeia molde de DNA foi realizada através da utilização da enzima *DpnI*, e o produto da reação de digestão foi utilizado para a transformação de células competentes XL10-Gold.

Tendo verificado a ausência de aparecimento de colónias transformantes, foi realizada uma nova reação de amplificação para os vários mutantes em estudo na qual foi utilizado o programa de amplificação inicial, alterando a temperatura de emparelhamento das sequências de oligonucleótidos para 70 °C. O aumento da temperatura de emparelhamento visou a diminuição de possíveis hibridações inespecíficas e a promoção do emparelhamento das sequências de oligonucleótidos com a sequência complementar na cadeia de DNA a amplificar. Terminada a reação de amplificação procedeu-se novamente à digestão da cadeia molde com *DpnI* e transformação em células competentes XL10-Gold e DH5α. A utilização de duas estirpes de células competentes foi realizada com intuito de aferir se a ausência de colónias transformantes, verificada inicialmente, se poderia ter devido a perda de competência das células XL10-Gold (fornecidas no *kit* utilizado). No entanto, verificou-se novamente a ausência de crescimento de colónias transformantes, tanto para as células competentes XL10-Gold como para as células da estirpe DH5α.

Posto isto, de forma a confirmar a presença dos genes *aioBA* no plasmídeo utilizado como molde na reação de amplificação, realizou-se a digestão do mesmo com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, incubando o produto de reação a 37°C durante 2 horas.

Terminado o período de incubação, a amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 %. Pela análise do resultado obtido, foi possível confirmar a presença de ambos os genes *aioB* e *aioA* bem como a integridade do plasmídeo recombinante utilizado, permitindo eliminar a possibilidade de insucesso por utilização de um plasmídeo molde inadequado.

Na tentativa de obter os mutantes desejados foram desenhadas novas sequências de oligonucleótidos complementares. A alteração das sequências, que consistiu no aumento do número de pares de bases, teve como intuito aumentar a probabilidade de hibridação dos mesmos com a sequência de DNA complementar do plasmídeo recombinante.

Repetiu-se o procedimento referido anteriormente, e verificou-se novamente a ausência de colônias transformantes para todos os mutantes em estudo.

Depois das várias tentativas de otimização do processo de mutagenese dirigida, foi ainda utilizado o *kit* de mutagenese dirigida NZYMutagenesis Kit. Este procedimento foi realizado no laboratório de Cristalografia de Proteínas, e o protocolo adotado apresentava algumas variações face ao utilizado com o *kit* QuikChange® II XL.

O plasmídeo recombinante, clonado com os genes *aioB* e *aioA*, foi novamente utilizado como molde para a mutação dos resíduos Asp169 e Glu453 pelo método de PCR, utilizando duas sequências de oligonucleótidos complementares que continham a mutação desejada. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 %, de forma a avaliar a eficiência de amplificação, encontrando-se os resultados apresentados na Figura 4.19.

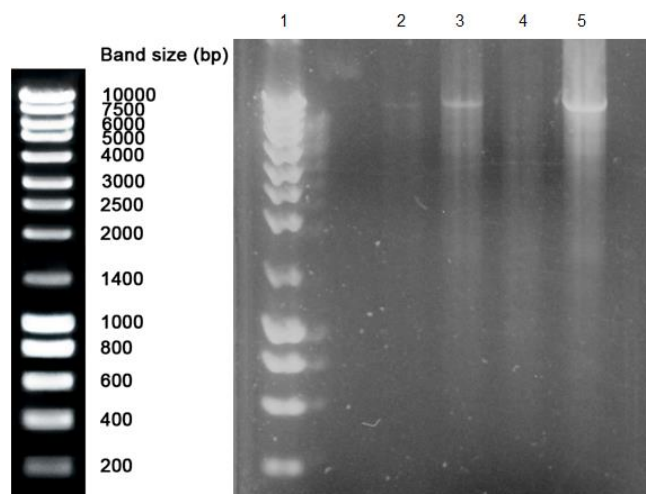


Figura 4.19. Resultados de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) dos produtos de amplificação obtidos (antes de digestão por *DpnI*). 1- Marcador de pesos moleculares NZY Ladder III (NZYTech); 2- AioA D169A; 3- AioA E453Q; 4- AioA D169N; 5- AioA E453A.

Pela análise do resultado obtido por eletroforese em gel de agarose é possível visualizar nitidamente a amplificação dos produtos de reação dos mutantes E453Q e E453A, uma amplificação menos nítida do produto de amplificação do mutante D169A, indicativa de uma menor quantidade de DNA amplificado, e a ausência de amplificação para o produto de reação do mutante D169N, indicando, neste último que a reação de amplificação poderá ter não ter sido eficaz.

Para as amostras em que se visualiza amplificação dos produtos de reação, as bandas têm cerca de 7500 bp, consistente com o peso molecular do vetor (4779 pb) clonado com os genes *aioB* (408 pb) e *aioA* (2538 pb).

Embora não tenha sido visualizada amplificação para todos os produtos de PCR, prosseguiu-se, para todas as amostras, para a digestão da cadeia molde por ação da enzima *DpnI*. A reação de digestão foi então utilizada para a transformação em células competentes DH5α de *E.coli*.

Tendo verificado o aparecimento de colônias transformantes procedeu-se ao isolamento de plasmídeos mutantes a partir de uma colônia única, e a confirmação das mutações foi realizada por sequenciação do gene *aioA*. Os resultados de sequenciação foram analisados no programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011), e encontram-se apresentados de forma sumariada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Resultados obtidos na sequenciação dos mutantes da subunidade AioA D169A/N e E453A/Q. O códons que codificam para os aminoácidos nas posições 169 e 453 encontram-se destacados na sequência de DNA.

| Gene | Sequência de DNA | Aminoácido codificado |
|--|---|-----------------------|
| <i>aioA</i> nativo (481-540 pb) | TCATCGTATCGGCCTTT GACC ATGGCGGTGCAGGCG GCGGCTACGA | Asp169 |
| <i>aioA</i> mutante D169A (481-540 pb) | TCATCGTATCGGCCTTT GCCC ATGGCGGTGCAGGCG GCGGCTACGA | Ala169 |
| <i>aioA</i> mutante D169N (481-540 pb) | TCATCGTATCGGCCTTT GACC ATGGCGGTGCAGGCG GCGGCTACGA | Asp169 |
| <i>aioA</i> nativo (1321-1380 pb) | GCGGCGTCGTACGCCTTGGCGGACACCAG GAAGGC TATGTGCGC | Glu453 |
| <i>aioA</i> mutante E453A (1321-1380 pb) | GCGGCGTCGTACGCCTTGGCGGACACCAG GCAGGC TATGTGCGC | Ala453 |
| <i>aioA</i> mutante E453Q (1321-1380 pb) | Sem resultados | - |

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4.10 é possível confirmar a mutação no mutante D169A, cuja alteração do codão GAC para GCC se traduz na alteração do aminoácido codificado, neste caso de um resíduo de aspartato para um resíduo de alanina (consultar Anexo 8, Tabela 7.4). A mutação foi também confirmada no mutante E453A, em que a alteração do codão GAA para GCA se traduz na alteração no aminoácido que codifica, neste caso para um resíduo de alanina.

Relativamente aos resultados obtidos para o mutante D169N, verifica-se a ausência de mutação, evidenciando que o DNA isolado poderia pertencer a uma colônia negativa, indicando, por sua vez, que a digestão da cadeia molde por ação da enzima *DpnI* poderá não ter sido totalmente eficaz. No que diz respeito ao mutante E453Q a ausência de resultados de sequenciação não permitiu confirmar a presença ou ausência da mutação desejada.

Posto isto, para estes dois últimos mutantes, deverá ser repetido o processo de transformação em células competentes DH5 α , utilizando DNA plasmídico previamente isolado, e repetir-se a sequenciação do gene *aioA* para confirmar se os plasmídeos recombinantes contêm ou não as mutações de interesse.

De qualquer forma, os resultados obtidos revelam que foi possível produzir os mutantes D169A e E453A da AioA, que poderão ser utilizados futuramente em estudos cinéticos e estruturais por cristalografia de raios-X, revelando a sua eventual importância no mecanismo de reação da enzima.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O arsénio é um contaminante que se encontra disperso por todo o mundo. As populações de países em desenvolvimento encontram-se particularmente em risco, uma vez que a exposição crónica a este elemento resulta no desenvolvimento de cancro e outras patologias. A Organização Mundial de Saúde recomendou um nível máximo de arsénio em água de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, mas as reservas de água de consumo em muitos países contêm níveis bastante mais elevados, existindo uma necessidade urgente para o desenvolvimento de métodos eficientes para a sua quantificação e remoção.

Atualmente, os processos de remediação de águas com As, utilizam métodos químicos como coagulação/co-precipitação, sorção/permuta iónica, precipitação ou filtração. A remoção de As(III) de ambientes contaminados implica no entanto, a sua oxidação, geralmente conseguida pela adição de fortes agentes oxidantes como ozono ou H_2O_2 . Este método não é o mais recomendado, especialmente em água para consumo, levando à procura de novas alternativas para a remediação de As.

Neste contexto, a oxidação bacteriana de As(III), pode consistir numa alternativa segura comparativamente aos métodos químicos, embora até à data, a maioria dos estudos de oxidação bacteriana de arsenito tenham sido realizados com bioreatores de pequena escala.

Talvez, devido ao estigma associado à contaminação bacteriana, os tratamentos de água de consumo com recurso a microorganismos não sejam, na generalidade, bem aceites, embora esta perceção possa ser alterada futuramente, assim que estas metodologias se tornem mais comuns. Estes sistemas ativos são promissores e estarão de certeza em funcionamento, num futuro próximo, pelo menos numa combinação com sistemas passivos, desenhados para aumentar a ocorrência natural de processos físicos, químicos e biológicos.

Para além do potencial das bactérias oxidantes de As(III) em processos de bioremediação, estas podem também revelar-se extremamente promissoras para a deteção de As, através da sua utilização em biossensores enzimáticos, permitindo uma rápida monitorização de rotina de sistema de tratamento de água e outras amostras revelantes, ao fornecer ensaios simples e baratos que possam ser realizados por trabalhadores ou pela própria população local, sem implicar formação extensiva.

Atualmente, existem vários biossensores para deteção de As(V) e As(III), sendo todos estes baseados no método Gutzeit, que envolve a reação de amostras de água com zinco metálico e HCl para gerar arsina (AsH_3). A arsina reage, por sua vez, com um papel indicador impregnado com brometo de mercúrio para gerar uma mancha colorida, cuja intensidade de cor indica a concentração de As.

Estes biossensores são de simples utilização e fornecem um resultado visual semi-quantitativo, mas apresentam vários inconvenientes, nomeadamente elevado número de falsos positivos na presença de baixas concentrações de As, elevada toxicidade da arsina e dos sais de mercúrio utilizados, bem como variabilidade na interpretação visual dos resultados.

Assim sendo, o desenvolvimento de biossensores enzimáticos com recurso à arsenito oxidase (Aio), a enzima bacteriana que catalisa a oxidação de arsenito a arsenato, poderá constituir uma alternativa sustentável para a deteção de As.

Na presente dissertação foi estudada a enzima arsenito oxidase (Aio), tendo escolhido como organismo de estudo o oxidante de arsenito *Alphaproteobacterium Rhizobium* sp.NT-26.

O principal objetivo foi contribuir para a clarificação do mecanismo de reação desta enzima ao caracterizar estruturalmente a proteína nativa ligada a análogos do substrato, bem como vários mutantes da enzima, tendo-se para isso utilizado uma combinação de cristalografia de raios-X e ensaios cinéticos.

A primeira etapa consistiu na expressão heteróloga e purificação das proteínas de estudo, tendo utilizado sistemas descritos anteriormente na literatura. A componente de biologia molecular para a proteína nativa e mutantes, alguns destes últimos obtidos anteriormente e outros desenvolvidos nesta dissertação, foi realizada em colaboração com a Professora Joanne Santini da University College of London.

Após expressão e purificação da AioAB nativa e dos mutantes em estudo AioA Q726G e AioB F108A, foi possível prosseguir para a realização de ensaios de cristalização. Foram utilizadas condições de cristalização previamente determinadas no laboratório de Cristalografia de Proteínas, elegendo como mais favoráveis as condições em que se utilizou uma solução precipitante de 0,1 M de tampão HEPES de sódio (pH entre 7,0 e 8,0), 2% PEG 400 e 2 M sulfato de amónio.

Adicionalmente, a variação da temperatura durante os ensaios de cristalização permitiu verificar que a realização das gotas a 4 °C, seguida do aumento gradual até 30 °C e diminuição progressiva até 4 °C favorece o crescimento de cristais de Aio, concluindo que a temperatura é um fator determinante para a obtenção de cristais de boa qualidade desta proteína.

Posto isto, para a AioAB nativa, procurou-se essencialmente a realização de *soakings* com compostos análogos ao substrato de modo a estudar possíveis interações. Por cristalografia de raios-X, conseguiu resolver-se e refinar com sucesso a estrutura tridimensional da AioAB incubada com o composto $[C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O]$, apresentando valores finais de fator R e R_{free} de 0,1985 e 0,2314, respetivamente.

Verificou-se a presença de densidade eletrónica ($2F_{obs}-F_{cal}$ e $F_{obs}-F_{calc}$) e densidade anómala junto do átomo de molibdénio do centro ativo da enzima, modelada na forma de antimonito. Tratando-se de um análogo ao substrato fisiológico da enzima, este resultado contribui para a clarificação do mecanismo de reação da enzima, sugerindo que a conformação adotada por arsenito, antes da sua oxidação a arsenato no centro ativo da enzima, poderá ser semelhante à observada com antimonito.

Relativamente ao átomo de molibdénio do centro ativo, foi possível observar uma geometria quadrangular piramidal por duas moléculas de pterina e um átomo de oxigénio, em oposição à geometria hexa-coordenada apresentada no mecanismo de reação proposto atualmente para a arsenito oxidase, concluindo-se que o átomo de molibdénio poderá ter sofrido redução no decurso da experiência de difração de raios-X.

Como perspetivas futuras, pretende-se repetir o *soaking* de cristais de AioAB nativa com $[C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O]$, visando a obtenção de melhores dados estruturais que permitam uma caracterização mais exata dos aductos arsenito-oxidase antimonito, bem como estudar e caracterizar, por cristalografia de raios-X, a interação da arsenito oxidase com outros análogos do substrato, bem como inibidores da enzima de forma a clarificar o mecanismo de reação da mesma.

Para os estudos com os mutantes AioA Q726G e AioB F108A, recorrendo a cristalografia de raios-X pretendia-se caracterizar estruturalmente possíveis alterações decorrentes das mutações realizadas, bem como, explorar o potencial dessas mesmas mutações na atividade da proteína em questão por espectroscopia de UV/Visível.

As estruturas dos mutantes AioA Q726G e AioB F108A foram resolvidas a 2,18 Å e 2,20 Å de resolução, respetivamente, e refinadas com sucesso, apresentando valores finais de fator R e R_{free} de 0,2830 e 0,3223, e 0,1839 e 0,2265, respetivamente. As estruturas encontram-se em fase de refinamento, tencionando-se brevemente proceder à sua validação e deposição na base de dados PDB. A análise das estruturas permitiu visualizar a existência de densidade eletrónica para as mutações realizadas e revelou a ausência de quaisquer alterações na estrutura global da proteína.

Para a estrutura do mutante AioA Q726G, verificou-se a mesma geometria piramidal quadrangular do átomo de molibdénio no centro ativo, mas a ausência de uma cadeia lateral que favoreça a transferência eletrónica entre o átomo de molibdénio e os restantes centros metálicos. Por sua vez, na estrutura do mutante AioB F108A foi possível verificar que a substituição pelo resíduo de alanina na posição 108 conduz ao aumento da exposição do centro de Rieske ao solvente.

Estes resultados sugerem que estes resíduos podem envolvidos no mecanismo reacional desta enzima, desempenhando um papel importante no mecanismo de transferência eletrónica.

Tendo em conta os resultados estruturais obtidos, os ensaios cinéticos por espectroscopia de UV/Visível foram levados a cabo com o objetivo de verificar se as mutações estudadas influenciavam e de que forma a atividade da proteína.

Os resultados preliminares obtidos pela realização de ensaios cinéticos permitiram a determinação de valores de atividade específica para a proteína nativa e para os mutantes. No entanto, tendo-se verificado uma discrepância significativa entre o valor obtido experimentalmente e o valor publicado na literatura para a proteína nativa, foi possível, desde logo, concluir que houve perda de atividade enzimática durante a purificação e a realização dos ensaios.

Assim sendo, os valores obtidos experimentalmente para os mutantes foram comparados com os obtidos experimentalmente para a proteína nativa. Embora os resultados obtidos sejam preliminares, foi possível constatar que a mutação realizada no resíduo 726 da subunidade AioA conduz à perda drástica de atividade da proteína, concluindo-se que a mutação provoca a diminuição de eficiência da cadeia de transporte eletrónico, fazendo com que o átomo de molibdénio permaneça mais tempo no estado reduzido, e, por isso, menos apto a realizar reações de oxidação-redução sucessivas.

Por sua vez, os resultados obtidos para o mutante AioB F108A demonstram o aumento da atividade específica, estando estes resultados de acordo com os resultados obtidos por cristalografia de raios-X, em que se visualizou o aumento da exposição do centro de Rieske. Deste modo, tudo indica que a substituição de fenilalanina por alanina na posição 108 da subunidade AioB, torna a cadeia de transporte eletrónico mais eficiente e rápida, conduzindo ao aumento de atividade verificado neste mutante.

Este resultado abre novas perspectivas para a utilização desta enzima a nível industrial em processos de bioremediação de As. A utilização de uma proteína mais ativa na oxidação de arsenito, como é o caso do mutante AioB F108A, apresenta um elevado potencial para o desenvolvimento de tecnologias limpas que visem a remoção mais eficiente de arsénio em ambientes contaminados, evitando ao mesmo tempo a utilização de agentes oxidantes mais tóxicos.

Pretende-se, no futuro, realizar a repetição e otimização de condições para a realização de ensaios cinéticos, visando obter resultados semelhantes aos publicados na literatura para a proteína nativa e a obtenção de resultados reprodutíveis para os mutantes em estudo. Paralelamente, pretende-se realizar ensaios cinéticos utilizando aceitadores de eletrões fisiológicos, nomeadamente citocromo c e azurina, de forma a verificar se na presença dos mesmos os resultados obtidos são semelhantes aos conseguidos utilizando DCPIP, um aceitador de eletrões não-fisiológico.

Na tentativa de estudar o papel desempenhado por outros resíduos no mecanismo reacional desta proteína, foi realizada mutagénese dirigida com vista à obtenção de novos mutantes, nomeadamente AioA D1969A/N e AioA E453A/Q. Este procedimento foi realizado no *Institute of Structural and Molecular Biology* da University College of London (Reino Unido) sob orientação da Professora Joanne Santini.

Depois de várias tentativas de otimização do processo, verificou-se o aparecimento de colônias transformantes para todos os mutantes. Procedeu-se ao isolamento de DNA plasmídico e foi realizada sequenciação do gene *aioA* para confirmação das diferentes mutações. Tendo em conta os resultados obtidos, foi possível confirmar a presença das mutações desejadas para D169A e E453A. No entanto, para os mutantes D169N e E453Q os resultados não foram positivos.

Assim sendo, como perspectivas futuras pretende-se obter os mutantes D169N e E453Q, sendo necessária a repetição da etapa de transformação e a nova sequenciação de forma a confirmar a presença das mutações de interesse.

Pretende-se também realizar, para os vários mutantes, as etapas de expressão, purificação e ensaios de cristalização, permitindo, idealmente, a obtenção das estruturas tridimensionais e a caracterização por cristalografia de raios-X. Tenciona-se ainda explorar o potencial dessas mesmas mutações na atividade da proteína por espectroscopia de UV/Visível.

Em suma, apesar de não ter sido conseguida a concretização plena de todos os objetivos propostos para a presente dissertação, ou de nem todos terem sido alcançados com sucesso, os resultados obtidos permitiram retirar algumas conclusões importantes sobre o mecanismo de reação da arsenito oxidase. Assim sendo, o projeto contribuiu para o avançar dos conhecimentos disponíveis nesta vasta área de investigação, abrindo portas a novas perspectivas no que diz respeito à bioremediação de arsénio a nível mundial.

6. Bibliografia

Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C. & Waalkes, M.: Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* 107:7 (1999), pp. 593-597.

Alloway, B. J.: Heavy Metals in Soils. 3rd edition, *Springer* (2013).

Anderson, G., Williams, J. & Hille, R.: The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), pp. 23674-23682.

Basu, A., Mahata, J., Gupta, S. & Giri, A.K.: Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488:2 (2001), pp. 171-194.

Berks, B.C., Palmer, T. & Sargent, F.: Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) Pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:2 (2005), pp. 174-181.

Blow, D.: Outline of Crystallography for Biologists. (2002).

Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. & Sun, P.D.: Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and a Fe₄S₄ cluster. *Science* 275: 5304 (1997), pp. 1305-1308.

Branco, R., Francisco, R., Chung, A.P. & Morais, P.V.: Identification of an aox system that requires cytochrome c in the highly arsenic-resistance bacterium *Ochrobactrum tritici* SCII24. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009), pp. 5141-5147.

Budinhoff, C.R. & Hollibaugh, J.T.: Arsenite-dependent photoautotrophy by an *Ectothiorhodospira*-dominated consortium. *ISME J.* 2 (2008), pp. 340-344.

Bundschuh, J., Nath, B., Bhattacharya, P., Liu, C., Armienta, M. A., López, M.M., Lopez, D.L., Jean, J., Cornejo, L., Macedo, L.F. & Filho, A.T.: Arsenic in the human food chain: the Latin America perspective. *Sci Total Environ.* 429 (2012), pp. 92-106.

Cai, L., Liu, G., Rensing, C. & Wang, G.: Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol.* 9:4 (2009).

Cantor, K.P., Ward, M.H., Moore, L & Lubin, J.: Water contaminants. In D. Schottenfeld & J.F. Fraumeni Jr. (eds): *Cancer epidemiology and prevention*. Oxford University Press, New York, USA, 2006, pp. 382-384.

Carvalho, A.L., Trincão, J. & Romão, M.J.: X-Ray Crystallography in Drug Discovery. *Methods Mol. Biol.* 572 (2009), pp. 31-56.

Casiot, C., Morin, G., Jullot, F., Burneel, O., Personne, J.C., Leblanc, M., Duquesne, K., Bonnefoy, V. & Poulichet, F.E.: Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoules Creek, France). *Water Res.* 37 (2003), pp. 2929-2936.

Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B.K., Chowdhury, T.R., Wamanta, G. & Chakraborti, D.: Arsenic in groundwater in 6 districts of West Bengal, India – the biggest arsenic calamity in the world 1. Arsenic species in drinking water and urine of affected people. *Analyst* 120 (1995), pp. 643-650.

Cheng, R.C., Liang, S., Wang, H.C. & Beuhler, M.D.: Enhanced Coagulation for Arsenic Removal. *J.American Water Works Association.* 86 (1994), pp. 79-90.

Cheng, H., Hu, T., Luo, J., Xu, B. & Zao, J.: Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *J. Hazard. Mat.* 165 (2009), pp.13-26.

Correia, M.A.S., Ortelo-Cardoso, A.R., Schwuchow, V., Clauss, K.G.V., Haumann, M., Romão, M.J. & Santos-Silva, T.: The *Escherichia coli* Periplasmic Aldehyde Oxidoreductase Is an Exceptional Member of the Xanthine Oxidase Family of Molybdoenzymes. *ACS Chem. Biol.* (2016). Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acscchembio.6b00572>.

Danaee, H., Nelson, H.H., Liber, H., Little, J.B. & Kelsey, K.T.: Low dose exposure to sodium arsenite synergistically interacts with UV radiation to induce mutations and alter DNA repair in human cells. *Mutagenesis* 19:2 (2004), pp. 143-148.

DeLano, W.: Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* (2002).

Diederichs, K. & Karplus, P. A.: Better models by discarding data? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69:7 (2013), pp. 1215-1222.

Dodson, E.J., Winn, M. & Ralph, A.: Collaborative Computational Project, number 4: providing programs for protein crystallography. *Methods Enzymol.* 277 (1997), pp. 620-633.

Duker, A.A., Carranza, E.J.M. & Hale, M.: Arsenic geochemistry and health. *Environ. Int.* 31 (2005), pp. 631-341.

Duquesne, K., Lieautaud, A., Ratouchniak, J., Muller, D., Lett, M.C. & Bonnefoy, V.: Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ. Microbiol.* 10 (2008), pp. 228-237.

Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R. & Kuhn, P.: Crystal structure of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9 (2001), pp. 125-132.

Emsley, P. & Cowtan, K.: Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 60:12 I (2004), pp.2126-2132.

Evans, P.R.: Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62 (2006), pp. 72-82.

Ferreccio, C., Gonzalez, C., Milosavljevic, V., Marshall, G., Sancha, A.M. & Smith, A.H.: Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology* 11:6 (2000), pp. 673-679.

Gale, R.: Crystallography Made Crystal Clear- A Guide for Users of Macromolecular Models - Third edition. *Academic Press*, (2006).

Gihring, T.M. & Banfield, J.F.: Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204 (2001), pp. 335-340.

Green, H.H.: Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *S. Afr. J. Sci.* 14 (1918), pp. 465-467.

Groundwater studies for arsenic contamination in Bangladesh. Phase I: Rapid Investigation Phase. BGS/MML Technical Report to Department of International Development, UK, 1999, 6 volumes.

Handley, K.M., Héry, M. & Lloyd, J.R.: Redox cycling of arsenic by the hydrothermal marine bacterium *Marinobacter santoriniensis*. *Environ. Microbiol.* 11 (2009), pp. 1601-1611.

Hei, T.K. & Filipie, M.: Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* 37:5 (2004), pp. 574-581.

Hernández, A. & Marcos, R.: Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics* 9:8 (2008), pp. 1113-1132.

- Hopenhayn, C.: Arsenic in drinking water: impacts on human health. *Elements* 2 (2006), pp. 103-107.
- Hudson-Edwards, K.A., Schell, C. & Macklin, M.G.: Mineralogy and geochemistry of alluvium contaminated by metal mining in the Rio Tinto area, southwest Spain. *Appl. Geochem.* 14 (1999), pp. 1015-1030.
- Huilin, L. & Thanassi, G.D.: Use of a combined cryo-EM and X-ray crystallography approach to reveal molecular details of bacterial pilus assembly by the chaperone/usher pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:3 (2009), pp. 326–332.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). International Agency for Research on Cancer special report: policy, a review of human carcinogens – part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 10:5 (2009), pp. 453-455.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H.: Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* (1991), pp. 409-411.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D. & Valko, M.: Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* 31:2 (2011), pp. 95-107.
- Kabsch, W.: XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66: 2 (2010), pp. 125-132.
- Karplus, P.A., & Diederichs, K.: Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science* 336:6084 (2012), pp.1030-1033.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J. & McDermott, T.R.: Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 188 (2006), pp. 1081-1088.
- Katsoyiannis, I.A. & Zouboulis, A.I.: Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwater. *Water Res.* 38 (2004), pp. 17-26.
- Kim, M.J. & Nriagu, J.: Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen. *Sci. Total Environ.* 247:1 (2000), pp. 71-79.
- Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Wei, M., Yunoki, T. & Fukushima, S.: Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221:3 (2007), pp. 295-305.
- Kligerman, A.D. & Tennaut, A.H.: Insights into the carcinogenic mode of action of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:3 (2007), pp. 281-288.
- Krishnan, V. & Rupp, B.: Macromolecular Structure Determination: Comparison of X-ray Crystallography and NMR Spectroscopy. eLS, (2012).
- Kostal, J., Yang, R., Nu, C.H., Mulchandani, A. & Chen, W.: Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:8 (2004), pp. 4582-4587.
- Kulp, T.R., Hoeft, S.E., Asao, M., Madigan, M.T., Hollibaugh, J.T., Fisher, J.C., Stolz, J.F., Culbertson, C.W., Miller, L.G. & Oremland, R.S.: Arsenic (III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science* 321 (2008), pp. 967-970.
- Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Muller, D., Lièvremon, P., Lett, M.C. & Nitschke, W.: Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003), pp. 686-693.
- Lièvremon, D., N'Negue, M.A., Behra, P. & Lett, M.C.: Biological oxidation of arsenite: Batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite. *Chemosphere.* 51:5 (2003), pp. 419-428.

- Li, J.H. & Rossman, T.G.: Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* 2:1 (1989), pp. 1-9.
- Lieutaud, A., van Lis, R., Duval, S., Capowiez, L., Muller, D., Lebrun, R., Lignon, S., Fardeau, M.L., Lett, M.C., Nitschke, W. & Schoepp-Cothenet, B.: Arsenite oxidase from *Ralstonia* sp.22: characterization of the enzyme and its interaction with soluble cytochromes. *J. Biol. Chem.* 285:27 (2010), pp. 20433-20441.
- Mattsson, J.: Documentation of Protein Crystallization, Techniques and Characterization of Crystals. (2011).
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J.: Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* 1:40 (2007), pp. 658-674.
- Meng, X., Bang, S. & Korfiatis, G.P.: Effects of silicate, sulfate, and carbonate on arsenic removal by ferric chloride. *Water. Res.* 34 (2000), pp. 1255-1261.
- Miller, W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J. & Waxman, J.: Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer. Res.* 62 (2002), pp. 3893-3903.
- Mondal, P., Majumder, C.B. & Mohanty, B.: Treatment of arsenic contaminated water in a laboratory scale up-flow bio-column reactor. *J. Hazard. Mater.* 153:1-2 (2008), pp. 136-145.
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T. & Silver, S.: Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:3 (2002), pp. 311-325.
- Muller, D., Medigue, C., Koecheler, S. *et al.*: A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet.* 4:e53 (2007).
- Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A. & Vagin, A.A.: REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst. Section D Biol. Crystallogr.* 67:4 (2011), pp.355-367.
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M. & Swaminathan, K.: Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass. *Biorestoration. Technol.* 97 (2006), pp. 483-487.
- Oremland, R.S. & Stolz, J.F.: The ecology of arsenic. *Science* 300 (2003), pp. 939-944.
- Oremland, R.S., Kulp, T.R., Switzer Blum, J., Hoelt, S.E., Baesman, S., Miller, L.G. & Stolz, J.F.: A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment: Searles Lake, California. *Science* 308 (2005), pp.1305-1308.
- Osborne, T.H., Jamieson, H.E., Hudson-Edwards, K.A., Nordstrom, D.K., Walker, S.R., Ward, S.A. & Santini, J.M.: Microbial oxidation of arsenite in a subarctic environment: diversity of arsenite oxidase genes and identification of a psychrotolerant arsenite oxidizer. *BMC Microbiol.* 10:205 (2010).
- Palus, J., Lewinska, D., Dziubaltowska, E., Stepnik, M., Beck, J., Rydzynski, K. & Nilsson, R.: DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environ. Mol. Mutagen.* 46:2 (2005), pp. 81-87.
- Plant, J.A., Kinniburgh, D.G., Smedley, P.L., Fordyce, F.M. & Klinck, B.A.: Arsenic and Selenium. *Treatise on geochemistry*. Elsevier, 2007, Chapter 9.02, pp. 17-66.
- Prasad, K.S., Subramanian, V. & Paul, J.: Purification and characterization of arsenite oxidase from *Arthrobacter* sp. *Biometals* 22:5 (2009), pp. 711-721.
- Read, R.J. & Schierbeek, A.J.: A phased translation function. *J. Appl. Cryst.* 21:5 (1988), pp.490-495.

- Ren, X., McHalle, C.M., Skibola, C.F., Smith, A.H., Smith, M.T. & Zhang, L.: An emerging role of epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 191:1 (2011), pp. 11-19.
- Rhine, D.E., Garcia-Dominguez, E., Phelps, C.D. & Young, L.Y.: Environmental microbes can speciate and cycle arsenic. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005), pp. 9569-9573.
- Richey, C., Chovanec, P., Hoeft, S.E., Oremland, R.S., Basu, P. & Stolz, J.F.: Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 382 (2009), pp. 298-302.
- Robinson, A.S.: Production of membrane proteins: strategies for expression and isolation. Wiley-VCH. (2011), pp. 11-35.
- Romão, M.J.: Cristalografia de Proteínas: Metodologias e Aplicações em Bioquímica. Boletim de Biotecnologia 53 (1996), pp. 18-36.
- Romão, M.J.: Molybdenum and tungsten enzymes: A crystallographic and mechanistic overview. *Dalton. Trans.* 21 (2009), pp. 4053-4068.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 172:5 (2014), pp. 1-17.
- Rosen, B.P.: Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529(2002), pp. 86-92.
- Rothery, R.A., Workun, G.J. & Weiner, J.H.: The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzymes family. *BBA-Biomembranes* 1178 (2008), pp. 1897-1929.
- Rupp, B.: Biomolecular Crystallography: Principles, practice and application to structural biology. *Garland Science* (2010).
- Saluta, M. & Bell, P.A.: Troubleshooting GST fusion protein expression in *E.coli*. *Life Science News.* (1998).
- Santini, J.M. & vanden-Hoven, R.N.: Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186:6 (2004), pp. 1614-1619.
- Santini, J.M., Kappler, U., Ward, S.A., Honeychurch, M.J., vanden Hoven, R.N. & Bernhardt, P.V.: The NT-26 cytochrome c_{552} and its role in arsenite oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007), pp. 189-196.
- Sardiwal, S., Santini, J.M., Osborne, T.H. & Djordjevic, S.: Characterisation of a two-component signal transduction system that controls arsenite oxidation in the chemolithoautotroph NT-26. *FEMS Microbiol. Lett.* 313 (2010), pp. 20-28.
- Sharma, V.K. & Shon, M.: Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ. Int.* 35 (2009), pp. 743-759.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G.: Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7: 539 (2011), pp. 1-5.
- Silver, S. & Phung, L.T.: Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005), pp. 818-823.
- Smedley, P.L. & Kinniburgh, D.G.: A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17 (2002), pp. 517-568.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M. & Oremland, R.S.: Selenium and arsenic in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60 (2006), pp. 107-130.

- Styblo, M., Drobna, Z., Jaspers, I., Lin, S. & Thomas, D.J.: The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ. Health. Perspect.* 110:suppl 5 (2002), pp. 767-771.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Milner, L. & Field, J.A.: Anaerobic oxidation of arsenite linked to chlorate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* (2010), pp. 6804-6811.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. & Sutton, D.J.: Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 101 (2012), pp. 133-164.
- Tegel, H., Ottosson, J & Hober, S.: Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *FEBS J.* 278:5 (2011), pp. 729-739.
- Tronrud, D.E.: Introduction to macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004), pp. 2156-2168.
- Tsai, S.-L., Singh, S. & Chen, W.: Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on bioremediation. *Curr. Opinion. Biotech.* 20 (2009), pp. 659-667.
- Turpeinen, R., Panssar-Kallio, M. & Kairesalo, T.: Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *Sci. Tot. Environ.* 285 (2002), pp. 133-145.
- vanden Hoven, R.N. & Santini, J.M.: Arsenite oxidation by the heterotrophy *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1656 (2004), pp. 148-155.
- Varenes, A.: Produtividade dos solos e ambiente. Escolar Editora, Lisboa (2003).
- Wang, S. & Mulligan, C.N.: Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *J. Hazard. Mater.* 138:3 (2006), pp. 471-476.
- Wang, Q., Warelow, T.P., Kang, Y.S., Romano, C., Osborne, T.H., Lehr, C.R., Bothner, B., McDermott, T.R., Santini, J.M. & Wang, G.: Arsenite oxidase also functions as an antimonite oxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6 (2015), pp. 1959-1965.
- Warelow, T.P., Oke, M., Schoepp-Cothenet, B., Dahl, J.U., Bruselat, N., Sivalingam, G.N., Leimkuehler, S., Thalassinou, K., Kappler, U., Naismith, J.H. & Santini, J.M.: The respiratory arsenite oxidase: structure and the role of residues surrounding the Rieske cluster. *PloS One* 8:8 (2013), e72535.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M.: Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal* 275:1 (2008), pp. 1-21.
- Yu, W.H., Harvey, C.F.: Arsenic in groundwater in Bangladesh: a geostatistical and epidemiological framework for evaluating health effects and potential remedies. *Wat. Res. Res.* 39:6 (2003), pp. 1-16.

7. Anexos

Anexo 1

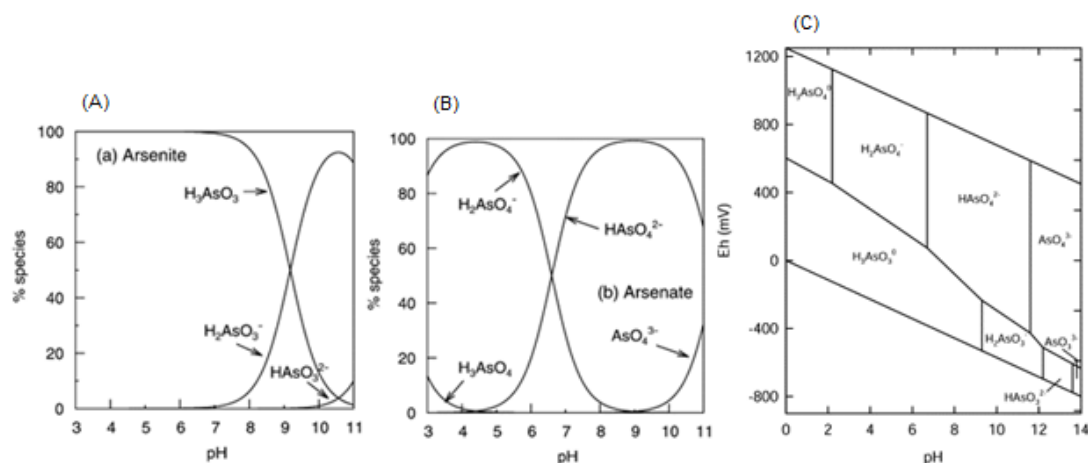


Figura 7.1. Diagramas de espécies inorgânicas de As(III) e As(V) em água. (A) Percentagem de espécies aquosas de arsenito [As(III)] em função do pH, a uma força iônica de 0,04 M; (B) Percentagem de espécies aquosas de arsenato [As(V)] em função do pH, a uma força iônica de 0,04 M; (C) Diagrama de estabilidade de Eh-pH para espécies aquosas de As a 25 °C, pressão total de 1 bar e atividade de $As(OH)_4^-$ (Adaptado de Meng *et al.*, 2000).

Tabela 7.1. Principais tecnologias de remoção de As de águas contaminadas (Adaptado de Cheng *et al.*, 1994).

| Tecnologia | Reagentes | Remoção de As (III) % | Remoção de As (V) % | Condições ideais | Redução de eficiência |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|--|
| Coagulação, filtração e precipitação | Cloreto férrico | < 30 | 90 - 95 | pH 6,0-8,0 | Sílica (pH de 6,5-7,5) pH (na gama não ótima) |
| | Sulfatos (alumínio, cobre, amônio) | < 30 | 80 - 90 | pH 6,0-6,5 | pH (na gama não ótima) |
| Adsorção | Óxido de alumínio ou carvão ativado | 30 - 60 | >95 | pH 5,5-6,0 | pH (na gama não ótima) |
| | Hidróxido de ferro | 30 - 60 | >95 | pH >> 8,0 | Sílica (pH de 6,5-7,5) pH (na gama não ótima) |
| Permuta iônica | Resinas aniônicas | < 30 | 80 - 95 | $[SO_4^{2-}] < 20$ mg/L | $[SO_4^{2-}] > 120$ mg/L (não viável) |
| Nanofiltração | - | 60 - 90 | >95 | Presença de As dissolvido | Presença de Fe e Mn (colmatação dos poros) |
| Osmose inversa | - | 80 - 95 | >95 | | |

Anexo 2

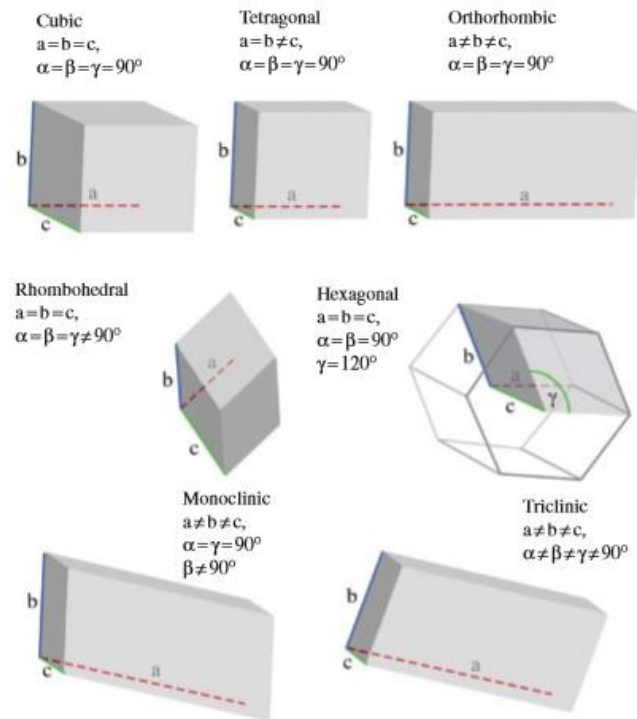


Figura 7.2. Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos (Adaptado de Gale, 2006).

| | | | | | | |
|--|---|---|--|---|---|---|
| $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$ Triclinic | $\alpha \neq 90^\circ$ $\beta, \gamma = 90^\circ$ Centered | $\alpha \neq 90^\circ$ $\beta, \gamma = 90^\circ$ Simple | $a \neq b \neq c$ Simple | $a \neq b \neq c$ Base Centered | $a \neq b \neq c$ Face Centered | $a \neq b \neq c$ Body Centered |
| Monoclinic | | | Orthorhombic | | | |
| $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$ Rhombohedral | $a \neq c$ Simple | $a \neq c$ Body Centered | $a \neq c$ Hexagonal | a Simple | a Body Centered | a Face Centered |
| Tetragonal | | | Cubic (or isometric) | | | |

Figura 7.3. Representação esquemática das 14 redes Bravais (Adaptado de Gale, 2006).

Anexo 3

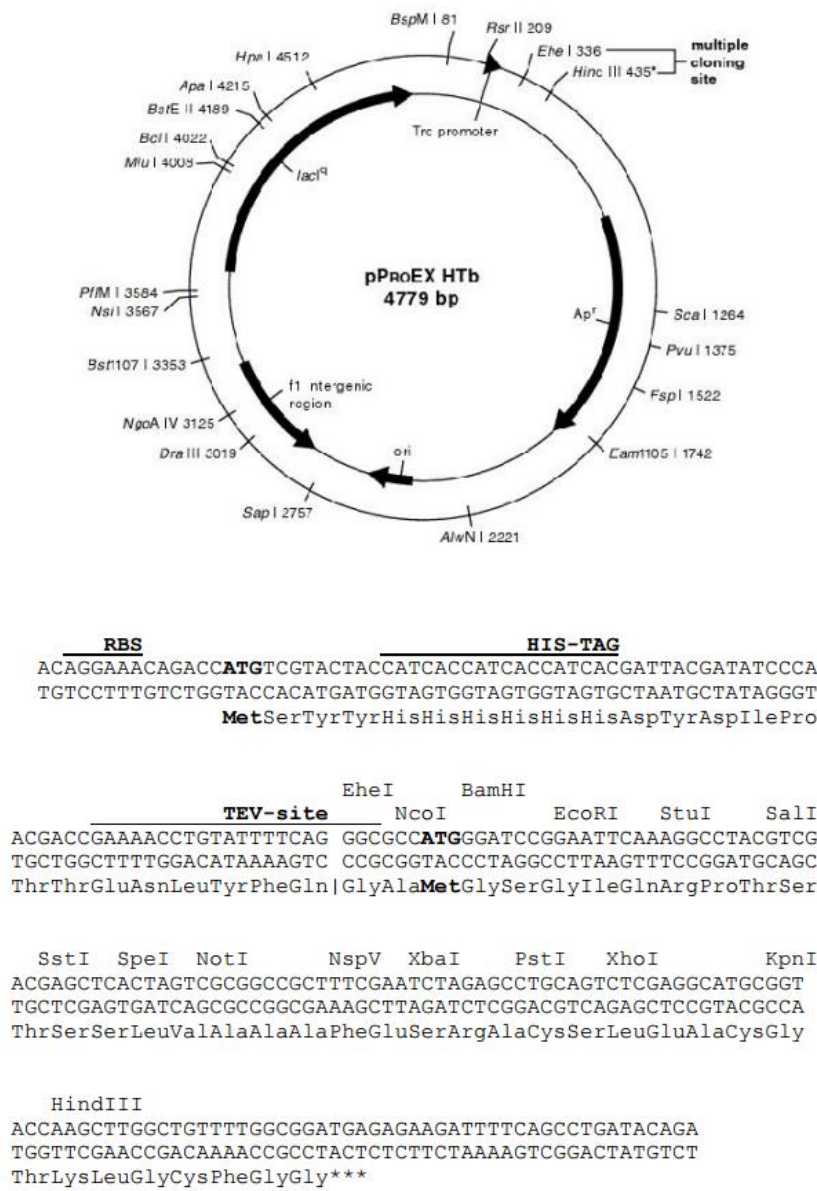


Figura 7.4. Mapa e sequência do vetor de expressão pProex-HTb (Invitrogen) utilizado para clonagem dos genes *aioBA*.

Anexo 4

Tabela 7.2. Composição do meio de expressão LB utilizado na expressão em *E.coli*. Os meios foram preparados em água miliQ e o pH ajustado para 7,0. De seguida, os meios foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos.

| Reagente | Composição | Marca |
|-------------------------|------------|---------------------------------|
| Triptona | 10 g/L | Bacto TM Tryptone BD |
| Extrato de levedura | 5 g/L | Fluka |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 10 g/L | Scahlau |

Anexo 5

Tabela 7.3. Condições de cristalização dos *screens* de cristalização 80! e Salt-Rx1.

| | |
|-----------------|--|
| 80! (1) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 30% MPD |
| 80! (2) | 0,1 M MES pH 6,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio |
| 80! (3) | 0,4 M Fosfato de amônio |
| 80! (4) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 3 M Sulfato de amônio |
| 80! (5) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Citrato de sódio; 30% MPD |
| 80! (6) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K |
| 80! (7) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1,2 M Citrato de sódio |
| 80! (8) | 0,2 M Citrato de sódio; 2M Sulfato de amônio |
| 80! (9) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,2 M Acetato de amônio; 30% PEG 400 |
| 80! (10) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 1,5 M Fosfato de amônio |
| 80! (11) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1,5 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1,5 M Fosfato hidrogénio di-sódio; 0,2 M Sulfato de amônio |
| 80! (12) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Citrato de sódio; 20% PEG 400 |
| 80! (13) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 25% PEG 4K |
| 80! (14) | 0,1 M MES pH 6,5; 0,1 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 8K |
| 80! (15) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,2M Sulfato de lítio; 30% PEG 4K |
| 80! (16) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 1 M Sulfato de lítio |
| 80! (17) | 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,2 M Fosfato de amônio; 30% MPD |
| 80! (18) | 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,2 M Acetato de amônio; 1,5 M Fosfato hidrogénio dipotássio; 1,5 M Fosfato dihidrogénio de sódio |
| 80! (19) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,1 M Sulfato de amônio; 30% PEG 8K |
| 80! (20) | 0,1 M MES pH 6,5; 30% MPD |
| 80! (21) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K |
| 80! (22) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% PEG 4K |
| 80! (23) | 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio |
| 80! (24) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Cloreto de cálcio |
| 80! (25) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,5 M Acetato de amônio; 30% MPD |
| 80! (26) | 0,1 M MES pH 6,5; 2 M Acetato de sódio |
| 80! (27) | 0,1 M MES pH 6,5; 0,2 M Tartarato de potássio/sódio; 30% PEG 8K |
| 80! (28) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1 M Tartarato de potássio/sódio |
| 80! (29) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Sulfato de amônio; 30% PEG 400 |
| 80! (30) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,1 M Sulfato de amônio; 20% PEG 4K |
| 80! (31) | 0,1 M MES pH 6,5; 2 M Sulfato de amônio |
| 80! (32) | 0,1 M MES pH 6,5; 0,2 M Cloreto de sódio; 30% Etanol |
| 80! (33) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% Etanol |
| 80! (34) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Acetato de amônio; 30% Etanol |
| 80! (35) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 30% Etanol |
| 80! (36) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% Etanol |
| 80! (37) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% Isopropanol |
| 80! (38) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 30% MPD 80! (39) - 0,1 M Acetato pH=4,5; 2 M Formato de sódio |
| 80! (39) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 2 M Formato de sódio |
| 80! (40) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Citrato de sódio; 40% Isopropanol |
| 80! (41) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% PEG 400; 10% Isopropanol |
| 80! (42) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1 M Sulfato de lítio |
| 80! (43) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de lítio; 30% PEG 4K |
| 80! (44) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Sulfato de amônio; 30% PEG 6K |
| 80! (45) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 1,5 M Acetato de sódio |
| 80! (46) | 0,1 M Citrato de sódio; 1 M Fosfato dihidrogénio de amônio |
| 80! (47) | 4M Formato de sódio |
| 80! (48) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1,2 M Citrato de sódio |
| 80! (49) | 0,4 M Tartarato de potássio/sódio |

| | |
|----------------------|---|
| 80! (50) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Cloreto de magnésio; 30% PEG 4K |
| 80! (51) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 1,4 M Acetato de sódio |
| 80! (52) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,2 M Acetato de amônio; 30% PEG 4K |
| 80! (53) | 0,1 M Citrato pH 4,5; 0,2 M Acetato de amônio 30% PEG 4K |
| 80! (54) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 28% PEG 400 |
| 80! (55) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Sulfato de amônio; 30% PEG 8K |
| 80! (56) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Acetato de magnésio; 30% PEG 8K |
| 80! (57) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M Acetato hidrogênio de amônio; 30% Isopropanol |
| 80! (58) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Sulfato de amônio; 25% PEG 4K |
| 80! (59) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Acetato de magnésio; 30% MPD |
| 80! (60) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 0,2 M Cloreto de cálcio; 20 % Isopropanol |
| 80! (61) | 0,1 M Imidazol pH 7; 1 M Acetato de sódio |
| 80! (62) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Citrato de sódio; 20 % Isopropanol |
| 80! (63) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Acetato de sódio; 30% PEG 8K |
| 80! (64) | 0,2 M Sulfato de amônio; 30% PEG 8K |
| 80! (65) | 0,2 M Sulfato de amônio; 30% PEG 4K |
| 80! (66) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1,6 M Fosfato hidrogênio di-potássio; 1,6 M Fosfato dihidrogênio de sódio |
| 80! (67) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 8% PEG 8K |
| 80! (68) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 8% PEG 4K |
| 80! (69) | 0,1 M HEPES pH 7,5; 1,8 M Fosfato dihidrogênio de amônio; 2% PEG 400 |
| 80! (70) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 20% PEG 4K; 20 % Isopropanol |
| 80! (71) | 0,05 M Fosfato hidrogênio di-potássio; 20% PEG 8K |
| 80! (72) | 30% PEG 1K |
| 80! (73) | 0,2 M Formato de magnésio |
| 80! (74) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Acetato de zinco; 18% PEG 8K |
| 80! (75) | 0,1 M Cacodilato pH 6,5; 0,2 M Acetato de cálcio; 18% PEG 8K |
| 80! (76) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 2 M Sulfato de amônio |
| 80! (77) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 2 M Sulfato de amônio |
| 80! (78) | 1 M Sulfato de lítio; 2% PEG 8K |
| 80! (79) | 0,5 M Sulfato de lítio; 18% PEG 8K |
| 80! (80) | 0,1 M Citrato pH 5,5; 0,2 M Acetato de amônio; 20 % PEG 4K; 20 % Isopropanol |
| Salt-Rx1 (81) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1,8 M Acetato de sódio |
| Salt-Rx1 (82) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1,5 M Cloreto de amônio |
| Salt-Rx1 (83) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 3,5 M Cloreto de amônio |
| Salt-Rx1 (84) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 2,2 M Cloreto de sódio |
| Salt-Rx1 (85) | 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 3,2 M Cloreto de sódio |
| Salt-Rx1 (86) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1 M Citrato de amônio |
| Salt-Rx1 (87) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 0,7 M Citrato de sódio |
| Salt-Rx1 (88) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 0,7 M Formato de magnésio |
| Salt-Rx1 (89) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 3,5 M Formato de sódio |
| Salt-Rx1 (90) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1,2 M Ácido Málico |
| Salt-Rx1 (91) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 2,2 M Ácido Málico |
| Salt-Rx1 (92) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1,4 M Malonato de sódio |
| Salt-Rx1 (93) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 1,5 M Nitrato de sódio |
| Salt-Rx1 (94) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 1,5 M Nitrato de sódio |
| Salt-Rx1 (95) | 0,1 M Acetato pH 4,5; 4 M Nitrato de sódio |
| Salt-Rx1 (96) | 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7; 4 M Nitrato de sódio |

Anexo 6

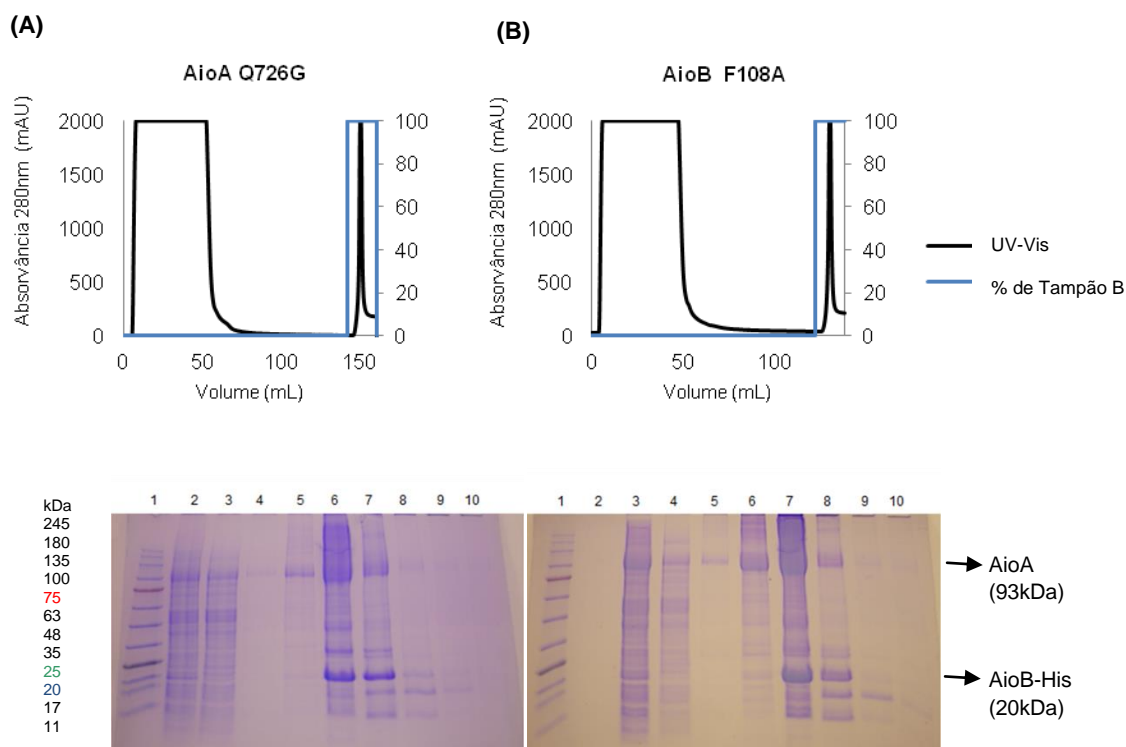


Figura 7.5. Resultados da purificação por IMAC: Cromatogramas e análise eletroforética em condições desnaturantes das frações recolhidas. (A) Resultados obtidos para a purificação do mutante AioA Q726G. SDS-PAGE a (12,5 %) com as frações provenientes da etapa de expressão e do primeiro passo de purificação. 1- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 2- Extrato solúvel; 3- Fração *Flow-through* (IMAC); 4 a 10- Frações de 1,5 mL provenientes da purificação por IMAC, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das frações. (B) Resultados obtidos para a purificação do mutante AioB F108A 1- Marcador de pesos moleculares Colour Protein Marker II; 2- Extrato total (amostra não carregada); 3- Extrato solúvel; 4- Fração *Flow-through* (IMAC); 5 a 10- Frações de 1,5mL provenientes da purificação por IMAC, sendo a ordem no gel (da esquerda para a direita) a ordem de eluição das frações.

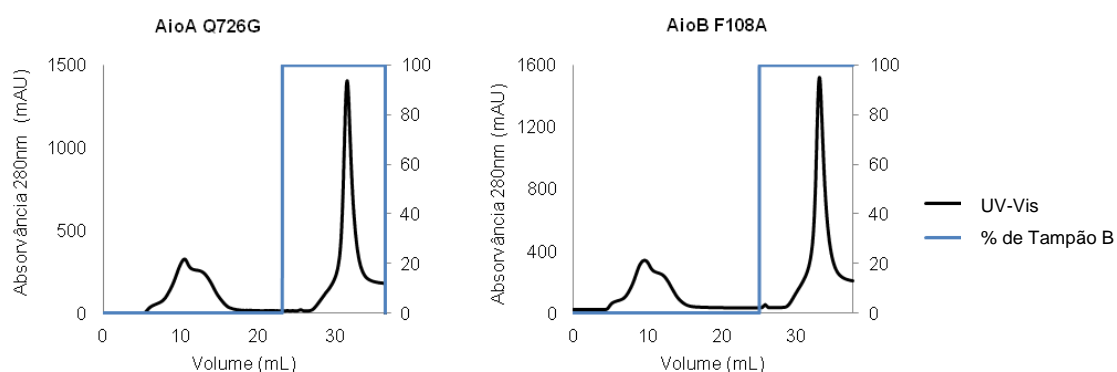


Figura 7.6. Cromatogramas obtidos na segunda etapa de purificação dos mutantes em estudo por IMAC. A eluição da proteína ocorreu na fase inicial de lavagem, tendo sido utilizada uma solução tampão de 20mM fosfato pH 7,3; 0,5 M NaCl e 20 mM imidazole.

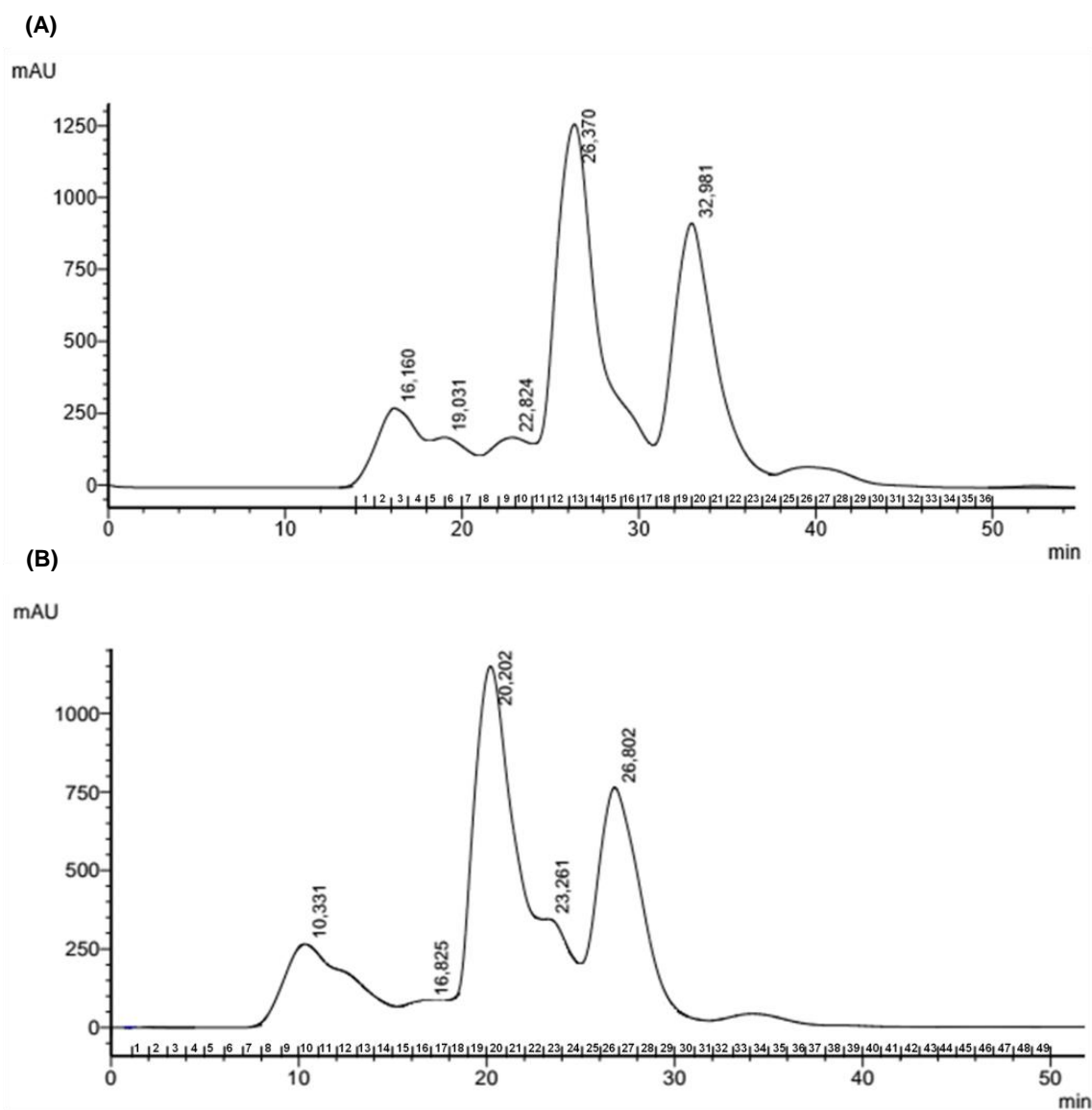


Figura 7.7. Cromatogramas obtidos na terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, utilizando um fluxo constante de 0,5 mL/minuto. (A) AioA Q726G, (B) AioB F108A.

Anexo 7

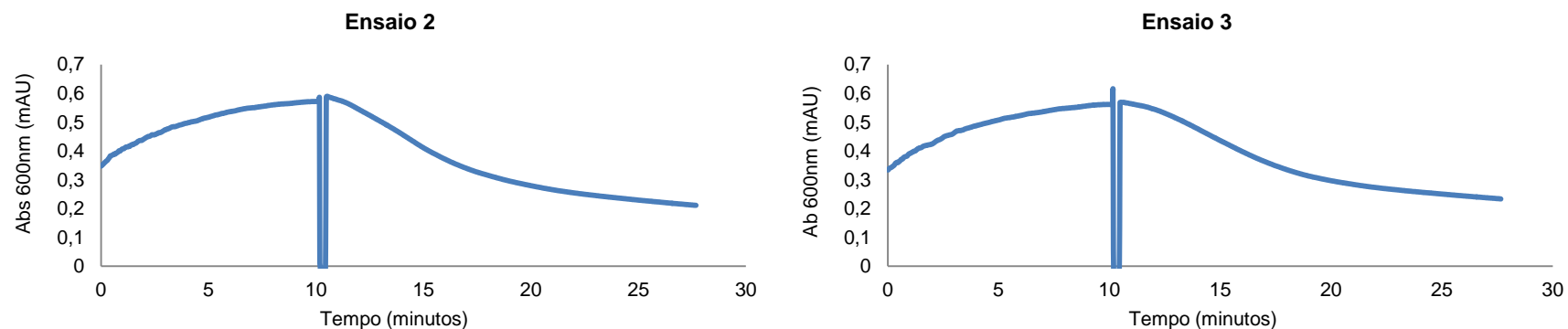


Figura 7.8. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para a AioAB nativa, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 µg de proteína dissolvida numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 µM de DCPIP numa solução tampão de 50 mM MES pH 5,5. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de ≈10 minutos), adicionou-se 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0.

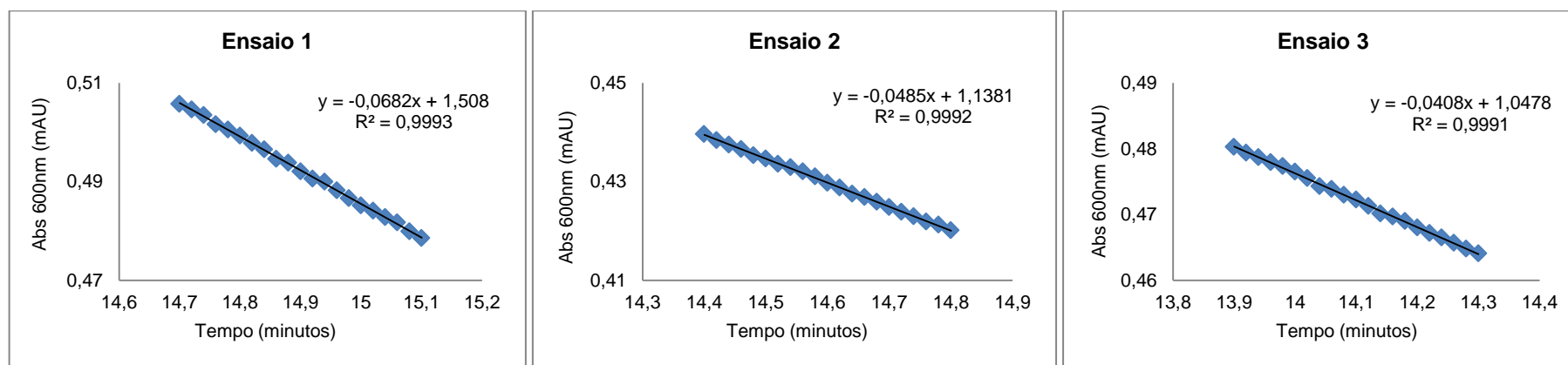


Figura 7.9. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos de AioAB nativa. As linearizações foram calculadas na zona de velocidade máxima da reação de redução de DCPIP. A linearização do ensaio 1 corresponde ao gráfico apresentado anteriormente no subcapítulo 4.2.3.

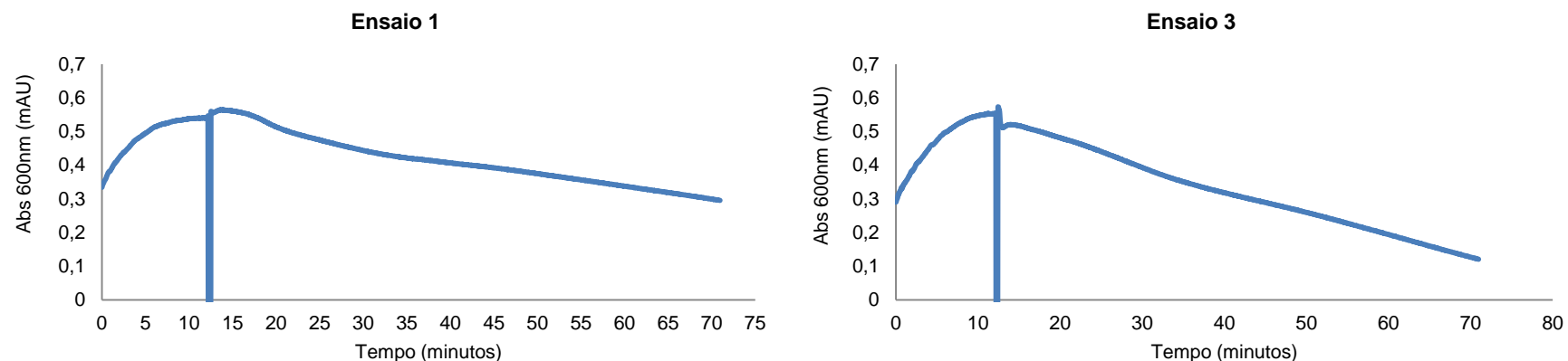


Figura 7.10. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para o mutante AioA Q726G, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 µg de proteína dissolvida numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 µM de DCPIP numa solução tampão de 50 mM MES pH 5,5. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de ≈12 minutos), adicionou-se 2,5 mM arsenito de sódio pH 8,0.

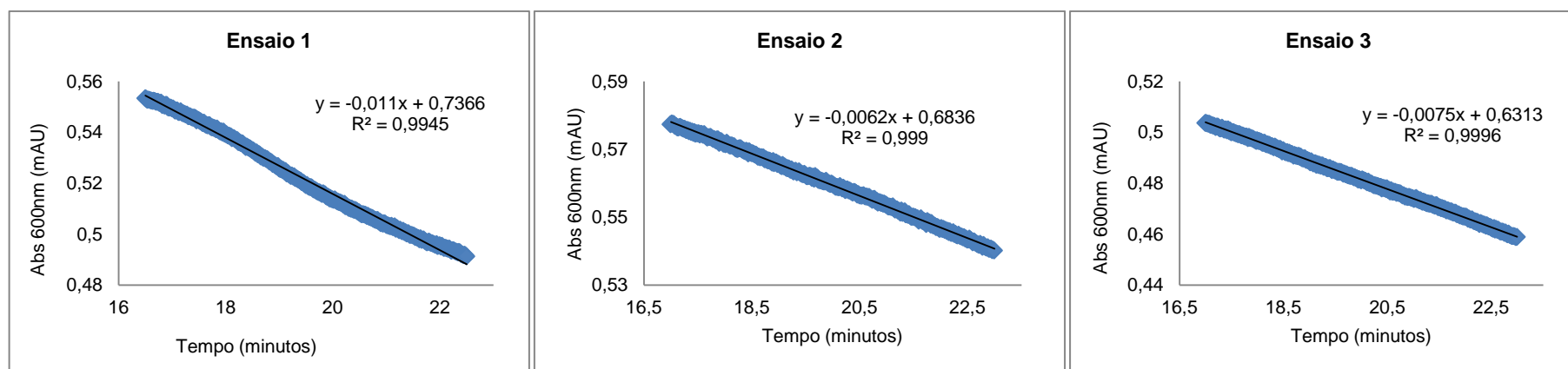


Figura 7.11. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos do mutante AioA Q726G. As linearizações foram calculadas na zona de velocidade máxima da reação de redução de DCPIP. A linearização do ensaio 2 corresponde ao gráfico apresentado anteriormente no subcapítulo 4.2.3.

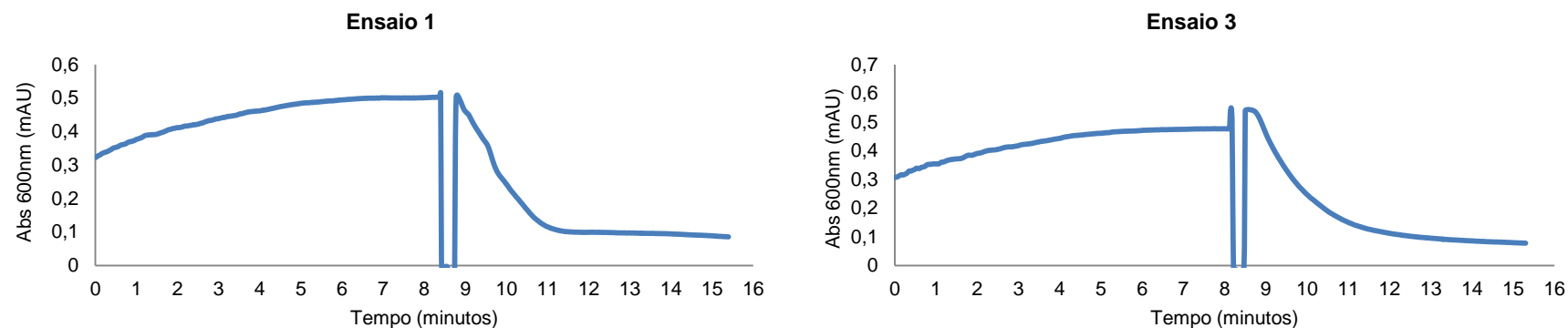


Figura 7.12. Representação gráfica dos replicados realizados nos ensaios cinéticos para o mutante AioB F108A, no qual foi feita a monitorização da absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Os ensaios foram realizados utilizando 20 µg de proteína dissolvida numa solução tampão de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 100 mM NaCl e 300 µM de DCPIP numa solução tampão de 50 mM MES pH 5,5. Depois da estabilização da solução de proteína e DCPIP (ao fim de ≈8 minutos), adicionou-se 2,5mM arsenito de sódio pH 8,0.

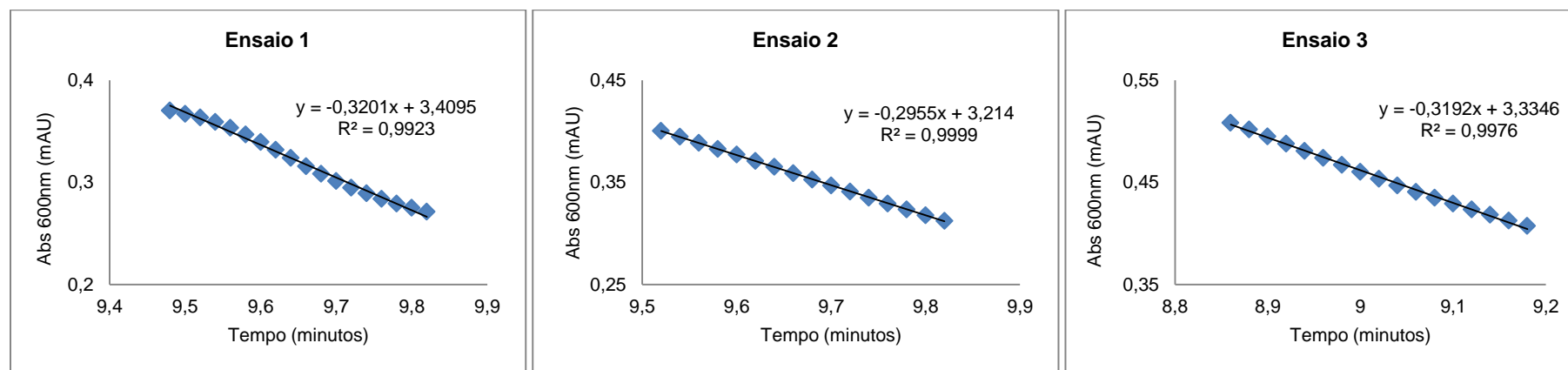


Figura 7.13. Representação gráfica das linearizações obtidas para os ensaios cinéticos do mutante AioB F108A. As linearizações foram calculadas na zona de velocidade máxima da reação de redução de DCPIP. A linearização do ensaio 2 corresponde ao gráfico apresentado anteriormente no subcapítulo 4.2.3.

Anexo 8

Tabela 7.4. Código genético para Bactéria, Archaea e Plantas.

| 2ª LETRA | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|---|
| T | | C | | A | | G | | | | |
| 1ª L E T R A | T | TTT | Phe | TCT | Ser | TAT | Tyr | TGT | Cys | T |
| | | TTC | | TCC | | TAC | | TGC | | C |
| | | TTA | Leu i | TCA | | TAA * | Ter | TGA | Ter | A |
| | | TTG | | TCG | | TAG * | | TGG | Trp | G |
| | C | CTT | Leu i | CCT | Pro | CAT | His | CGT | Arg | T |
| | | CTC | | CCC | | CAC | | CGC | | C |
| | | CTA | | CCA | | CAA | CGA | A | | |
| | | CTG | | CCG | | CAG | CGG | G | | |
| | A | ATT | Ile i | ACT | Thr | AAT | Asn | AGT | Ser | T |
| | | ATC | | ACC | | AAC | | AGC | | C |
| | | ATA | | ACA | | AAA | AGA | A | | |
| | | ATG | ACG | AAG | | Lys | AGG | Arg | G | |
| | G | GTT | Val | GCT | Ala | GAT | Asp | GGT | Gly | T |
| | | GTC | | GCC | | GAC | | GGC | | C |
| | | GTA | | GCA | | GAA | GGA | A | | |
| | | GTG | | GCG | | GAG | Glu | GGG | | G |
| 3ª L E T R A | | | | | | | | | | |

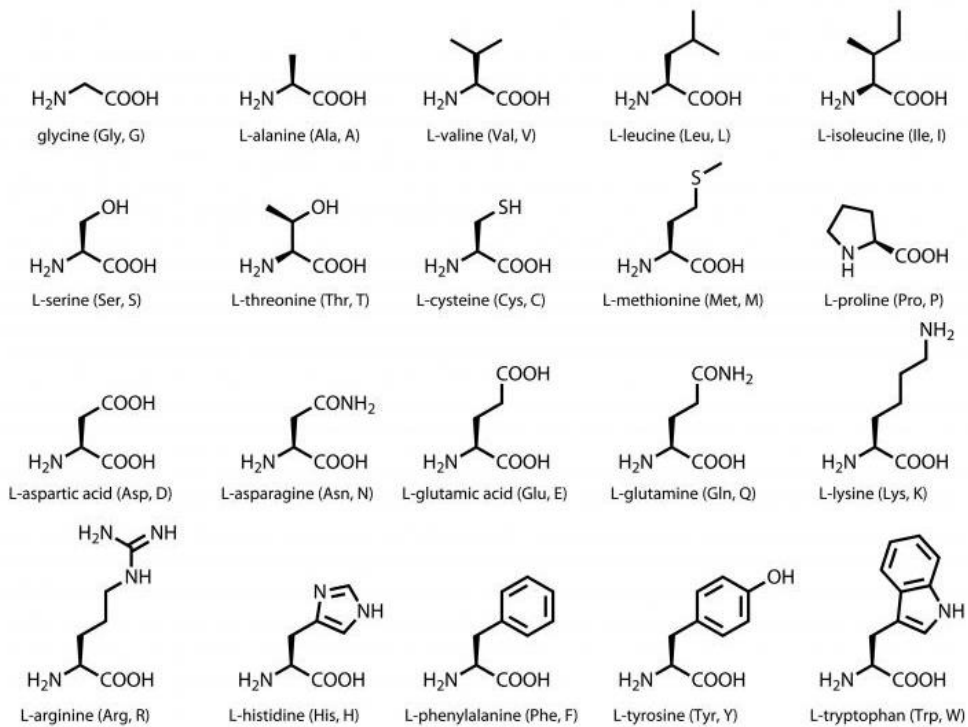


Figura 7.14. Estrutura dos 20 aminoácidos essenciais.